



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

CAMILA MAGALHÃES CARDADOR

Avaliação da influência da matriz extracelular no desenvolvimento de metástases pulmonares em modelos de tumor de mama após o tratamento com doxorrubicina associada à nanoemulsões

Brasília, DF
Agosto, 2018



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

CAMILA MAGALHÃES CARDADOR

Avaliação da influência da matriz extracelular no desenvolvimento de metástases pulmonares em modelos de tumor de mama após o tratamento com doxorrubicina associada à nanoemulsões

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia animal da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestra em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

Brasília, 2018

Dedico este trabalho à minha amada mãe, Maira, e à memória de meu querido pai, Sérgio, exemplos de força, integridade e resiliência. Sem vocês eu nada seria.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Sérgio, cuja memória encontra-se presente em absolutamente todos os dias de minha vida. Sua ausência só aumenta o tamanho do amor, admiração e carinho que já eram imensuráveis em vida. Obrigada por ser o maior e melhor exemplo que eu poderia ter tido.

À minha mãe, Maira, fonte inspiradora e instigante que nunca me deixou dar nada menos que o melhor que eu poderia. Obrigada por me incentivar a ser o melhor que posso ser, por todo apoio emocional, financeiro e diário. Sem você nada disso teria sido possível.

Aos meus irmãos, Sérgio e Felipe, por toda competitividade e cuidado velado ao longo dos anos.

Ao meu melhor amigo, fiel e leal companheiro, Nivaldo, por todo o companheirismo, carinho, amor, cuidado, compreensão, paciência, conselhos e motivação para seguir adiante. Poucas pessoas sabem o processo árduo, e às vezes doloroso, que foi a realização deste Mestrado, e ele é uma dessas poucas pessoas. Obrigada por embarcar comigo e deixar de lado sua vida, mesmo que por pouco tempo, para me acompanhar em uma das maiores aventuras da minha. Obrigada por me ajudar a manter o eixo e não desistir de nada, nunca. Obrigada por acreditar em mim e por me fazer sentir especial todos os dias. Te desejo a melhor e maior sorte do mundo na sua jornada que agora se inicia. Te amo!

À minha tia Gal, por todo suporte e conselhos sábios nas horas de desespero. Obrigada por me animar e fazer as comidas mais deliciosas que existem nesse mundo e por celebrar a minha existência com tanto entusiasmo! Você faz parte da família que eu escolhi, e que levo com todo o amor no coração.

Ao meu gato, José Átila B, por ser companhia diária e consolo nas horas em que precisei.

Aos meus cachorros, Fefo, Lulu, Bilbo, Nina, Pipoca, Nega, Urso e Toddy por serem incentivo para continuar em frente, me alegrando e sujando minhas roupas. Obrigada por me escolherem!

Aos meus amigos, Ricardo e Amanda, por serem os melhores amigos que eu um dia poderia ter pedido. Nada nesse mundo se compara à sensação de se sentir amado e amparado. Obrigada pela companhia em noites insones, pelos rolês naninhas e por se fazerem presente mesmo eu estando em outro continente, além de todo o resto que vocês fazem por mim diariamente.

Ao meu querido Caio, por ser um irmão de alma, e por me fazer querer ser sempre uma pessoa melhor. Obrigada pelas noites de sushi e conselhos. Você me inspira!

À Dalila, fiel companheira e escudeira de jornada! Obrigada por todo incentivo, por me mostrar o lado bom das coisas e por não me deixar desistir de nada sem tentar. Obrigada por ser um exemplo e por me deixar esconder no seu laboratório às vezes. Obrigada por se importar com minha sanidade mental mais do que eu mesma e estar sempre feliz pelas minhas conquistas e, principalmente, por acreditar em mim mais do que eu mesma! Vou te levar comigo sempre.

À Ana Lygia Câmara, minha mãe científica, por todos os ensinamentos que me destes. Obrigada por ser uma das maiores incentivadoras nesse processo, pelos puxões de orelha e por exigir o máximo que eu posso dar, sempre. Obrigada por ter acreditado no meu potencial e por ter cuidado de mim desde o primeiro momento e, mesmo que à distância, até hoje. Sem você eu não seria metade do que sou. Sinto falta da sua energia e sotaque perto de mim todos os dias, te quero de volta!



Ao Prof. Dr. João Paulo Figueiró, meu orientador, por aceitar o desafio que foi me orientar ao longo desses quatro anos de parceria. Obrigada por acreditar em mim e por todo conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes, pela oportunidade e apoio ao longo dos anos.

À Dra. Jaqueline Rodrigues, conselheira para as piores e melhores horas. Obrigada por todo auxílio e conselhos valiosos que me levaram até à Itália! Obrigada por acreditar que eu conseguiria!

À dona Zélia por toda sua disponibilidade e auxílio! Obrigada por estar sempre disponível e pelo carinho com que zelou por todos no laboratório ao longo de todos esses anos. Digo com propriedade que sentimos sua falta! Obrigada!

Ao meu grupo de pesquisa pelas reuniões e insights necessários para realização deste trabalho, obrigada!

À Karen Py-Daniel e ao Diogo Magnobosco, que desempenham um trabalho essencial para o bom funcionamento do laboratório e das atividades.

À Amanda Cabral pelo incentivo em chegar até aqui. Obrigada!

À Aline, da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, por toda dedicação e excelente desempenho do seu trabalho! Obrigada por me auxiliar na hora em que mais precisei!

À Universidade de Brasília pelos últimos 6 anos e pelos que ainda virão.

À CAPES pelo essencial apoio financeiro.

À FAP-DF pelo apoio financeiro para realização do mestrado sanduíche em Roma, Itália.

To the Università di Roma La Sapienza for receiving me as a master's degree student.

To my dearest friends in Rome: Marti, Penny and Ale! Thank you for receiving me as a friend and treat me as family. You are the best and I miss you all very much!



expecto patronum!

RESUMO

No câncer de mama as metástases estão intimamente relacionadas com modificações na matriz extracelular, onde a modificação mais proeminente observada em estudos recentes é o aumento da deposição de colágeno. As terapias atuais são pouco eficazes em impedir o desenvolvimento e progressão da doença, bem como a reincidência da mesma ao longo dos anos. Com o intuito de incrementar os efeitos da terapia, a associação entre a nanotecnologia e os fármacos utilizados busca melhorar aspectos do tratamento como a eficácia e diminuir os efeitos adversos relacionados ao seu uso. No presente trabalho um modelo de enxerto tumoral de células de carcinoma mamário murino (4T1@ATCC), a uma concentração de 4×10^4 células/50 μ L de meio de cultivo, enxertadas no flanco esquerdo de camundongos BalbC fêmeas foi utilizado para avaliação da eficácia do quimioterápico doxorrubicina associado a nanoemulsões e administração simultânea de losartana. Visando potencializar o efeito da terapia, a administração simultânea de losartana foi utilizada como uma tentativa de diminuir os níveis de deposição de colágeno na matriz extracelular de tecidos pulmonares e facilitar a chegada do fármaco aos sítios alvos por meio da ação descompressora dos vasos que permeiam o microambiente tumoral. O tratamento foi administrado por cinco dias consecutivos após quatro semanas do enxerto, nas concentrações de 20mg/kg para doxorrubicina em sua forma livre, 20mg/kg+ 40mg/kg para doxorrubicina livre e losartana, 40mg/kg para doxorrubicina associada a nanoemulsão e 40mg/kg + 40mg/kg para doxorrubicina associada a nanoemulsão e losartana, respectivamente. O acompanhamento *in vivo* do estado clínico dos camundongos ao longo de cinco semanas mostrou que o tratamento com nanoemulsão e losartana não foi tóxico, enquanto a doxorrubicina promoveu toxicidade que pôde ser observada no comportamento e aspecto físico dos camundongos. As avaliações *ex vivo* de materiais biológicos realizadas por meio de histologia, imunohistoquímica, ELISA e contagem de nódulos corroboram dados encontrados em estudos científicos, como o menor nível de colágeno nos grupos com administração simultânea de losartana e menor grau metastático. Concluiu-se que a doxorrubicina associada a nanoemulsões e administração de losartana não apresentou diferenças significativas em comparação à doxorrubicina em sua forma livre quando se trata da atividade antitumoral no sítio primário, mas foi capaz de diminuir o grau de colágeno encontrado nos tecidos, bem como as metástases nos tecidos pulmonares, não apresentando toxicidade significativa para os camundongos.

Palavras-chave: nanoemulsão; doxorrubicina; metástase; colágeno; losartana; nanotecnologia

ABSTRACT

In breast cancer metastasis are closely related to changes in the extracellular matrix, where the most prominent modification observed in recent studies is the increase in collagen deposition. Current therapies are poorly effective in preventing the development and progression of the disease, as well as its recurrence over the years. In order to increase the effects of therapy, the association between nanotechnology and the drugs aims to improve treatment efficacy and to reduce adverse effects related to its use. In the present work a murine mammary carcinoma cell (4T1@ATCC) tumor graft model, at a concentration of 4×10^4 cells/50 μ l culture medium, grafted on the left flank of female BalbC mice was used to evaluate the efficacy of doxorubicin with nanoemulsions and simultaneous administration of losartan. In order to potentiate the effect of the therapy, the simultaneous administration of losartan was used as an attempt to decrease the levels of collagen deposition in the extracellular matrix of lung tissues and to facilitate the drug delivery at the target sites through the decompressive action of the vessels that permeate the tumor microenvironment. The treatment was administered for five consecutive days after four weeks of grafting, at concentrations of 20mg/kg for doxorubicin in its free form, 20mg/kg + 40mg/kg for free doxorubicin and losartan, 40mg/kg for doxorubicin associated with nanoemulsion and 40mg/kg + 40mg/kg for doxorubicin associated with nanoemulsion and losartan, respectively. In vivo monitoring of the clinical status of mice over five weeks showed that treatment with nanoemulsion and losartan was non-toxic, whereas doxorubicin promoted toxicity that could be observed in the behavior and physical appearance of the mice. Ex vivo evaluations of biological materials performed using histology, immunohistochemistry, ELISA and lung nodule counts corroborate data found in scientific studies, such as the lower level of collagen in the groups with simultaneous administration of losartan and lower metastatic degree. It was concluded that doxorubicin associated with nanoemulsions and administration of losartan did not present significant differences compared to doxorubicin in its free form when it treated the antitumor activity at the primary site, but was able to decrease the degree of collagen found in the tissues, as well as metastasis in the lung tissues, showing no significant toxicity to the mice.

Keywords: nanoemulsion; doxorubicin; metastasis; collagen; losartan; nanotechnology

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DIFERENTES CONFORMAÇÕES DO COLÁGENO. A. COLÁGENO FUNCIONAL EM TECIDOS SAUDÁVEIS. B. COLÁGENO DESCOMPACTADO, ALINHADO ENCONTRADO EM TECIDOS TUMORAIS.....	22
FIGURA 2 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
FIGURA 3 - VARIAÇÃO DA MÉDIA DOS PESOS DOS CAMUNDONGOS AO LONGO DE 5 SEMANAS	37
FIGURA 4 – A) PESO CORPÓREO DOS CAMUNDONGOS NO DIA DA EUTANÁSIA DECRESCIDO DO PESO DO TUMOR, OBTIDO APÓS EXCISÃO PÓS-EUTANÁSIA E B) RELAÇÃO DO PESO TUMORAL COM O PESO DO CAMUNDONGO	38
FIGURA 5 - VARIAÇÃO DO VOLUME TUMORAL EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM DOX LIVRE, DOX LIVRE + LOS, NEDOX, NEDOX + LOS E SOLUÇÃO SALINA	39
FIGURA 6 - FOTOS DA SEMANA 1 APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DOS GRUPOS DE TRATAMENTO. (A) DOXORRUBICINA LIVRE, (B) DOXORRUBICINA LIVRE + LOS, (C) NEDOX E (D) NEDOX + LOS.....	40
FIGURA 7- FOTOS DA SEMANA 2 APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DOS GRUPOS DE TRATAMENTO. (A) DOXORRUBICINA LIVRE, (B) DOXORRUBICINA LIVRE + LOS, (C) NEDOX E (D) NEDOX + LOS.....	41
FIGURA 8 - FOTOS DA SEMANA 3 APÓS A ADMINISTRAÇÃO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO. (A) DOXORRUBICINA LIVRE, (B) DOXORRUBICINA LIVRE + LOS, (C) NEDOX E (D) NEDOX + LOS.....	41
FIGURA 9 - FOTOS DA SEMANA 4 APÓS A ADMINISTRAÇÃO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO. (A) DOXORRUBICINA LIVRE, (B) DOXORRUBICINA LIVRE + LOS, (C) NEDOX E (D) NEDOX + LO	42
FIGURA 10 – GRÁFICO DE SOBREVIVÊNCIA DOS GRUPOS COM DOX LIVRE, DOX LIVRE + LOS, NEDOX, NEDOX + LOS E SOLUÇÃO SALINA.	43
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DA RELAÇÃO DO PESO PULMONAR E O PESO DO CAMUNDONGO EXPRESSO EM MÉDIA DO GRUPO.....	44
FIGURA 12 - MÉDIA DO NÚMERO DE NÓDULOS EM CADA GRUPO. BARRAS REPRESENTAM ERRO PADRÃO.....	45
FIGURA 13 – MÉDIA DO PESO DOS CORAÇÕES EM CADA GRUPO EXPERIMENTAL.....	46
FIGURA 14 - CONCENTRAÇÃO DE TGF-B EXPRESSA EM MÉDIA DOS GRUPOS, COM BARRAS REPRESENTANDO ERRO PADRÃO. LEITURA DE ABSORBÂNCIA A 450NM.....	47
FIGURA 15 - CONCENTRAÇÃO DE GM-CSF EXPRESSOS EM MÉDIA DE GRUPO, COM BARRAS REPRESENTANDO ERRO PADRÃO. LEITURA DE ABSORBÂNCIA A 450NM.....	48
FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIAS DE TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGO TRATADO COM DOX LIVRE. AUMENTOS DE (A) 40X E B) 60X, COM BARRAS REPRESENTANDO 400 μ M E 50 μ M, RESPECTIVAMENTE.....	49

FIGURA 17 - FOTOMICROGRAFIAS DE TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGO TRATADO COM DOX LIVRE + LOSARTANA. AUMENTOS DE (A) 10X, (B) 20X, (C) 40X E (D) 60X, COM BARRAS REPRESENTANDO 400MM, 200MM, 100MM 50MM, RESPECTIVAMENTE.	50
FIGURA 18 - FOTOMICROGRAFIAS DE TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGO TRATADOS COM NEDOX. AUMENTOS DE (A) 10X, (B) 20X, (C) 40X E (D) 60X, COM BARRAS REPRESENTANDO 400 MM, 200 MM, 100 MM E 50 MM, RESPECTIVAMENTE.	51
FIGURA 19 - FOTOMICROGRAFIAS DE TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGO TRATADO COM NEDOX + LOS. AUMENTOS DE (A) 10X, (B) 20X, (C) 40X E (D) 60X, COM BARRAS REPRESENTANDO 400 μ M, 200 μ M, 100 μ M 50 μ M, RESPECTIVAMENTE.	52
FIGURA 20 - FOTOMICROGRAFIAS DE TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGO TRATADO COM SOLUÇÃO SALINA. AUMENTOS DE (A) 10X, (B) 20X, (C) 40X E (D) 60X, COM BARRAS REPRESENTANDO 400 μ M, 200 μ M, 100 μ M 50 μ M, RESPECTIVAMENTE. RECORTE COM BORDAS AMARELAS REPRESENTA ZOOM DA REGIÃO COM COM CÉLULAS POSSIVELMENTE CANCEROSA.	53
FIGURA 21 - FOTOMICROGRAFIAS PARA EFEITOS DE CONTROLE DE COLÁGENO, MARCADO EM AZUL COM TRICROMO MASSON. AUMENTO DE 10X, BARRAS REPRESENTAM 400 μ M.	54
FIGURA 22 - FOTOMICROGRAFIA DE MARCAÇÃO PARA COLÁGENO REALIZADA COM TRICROMO MASSON. AUMENTO DE 40X, BARRAS REPRESENTAM 100 μ M. A) DOX LIVRE + LOS, B) DOX LIVRE, C) NEDOX + LOS, D) NEDOX, E) SOLUÇÃO SALINA E F) SADIO.	55
FIGURA 23 - ÁREA DE COLÁGENO POR EM LÂMINAS HISTOLÓGICAS DE TECIDO PULMONAR CORADAS COM TRICROMO MASSON. VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA POR GRUPO, BARRAS REPRESENTANDO ERRO PADRÃO.	56
FIGURA 24 - FOTOMICROGRAFIA DE MARCAÇÃO PARA COLÁGENO REALIZADA POR IMUNOHISTOQUÍMICA. ÁREAS MARRONS SÃO POSITIVAS PARA COLÁGENO, ENQUANTO ÁREAS ROXAS SÃO NEGATIVAS. AUMENTO DE 40X, BARRAS REPRESENTAM 100 μ M. A) DOX LIVRE + LOS, B) DOX LIVRE, C) NEDOX+LOS, D) NEDOX E F) SADIO.	57
FIGURA 25 – ÁREA DE COLÁGENO POR MARCAÇÃO COM IMUNOHISTOQUÍMICA EM TECIDO PULMONAR. VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA POR GRUPO, BARRAS REPRESENTANDO ERRO PADRÃO.	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - LISTA DE MATERIAL UTILIZADO NA EXPERIMENTAÇÃO DO TRABALHO.....	28
TABELA 2 - GRUPOS DE TRATAMENTO, DOSES E NÚMEROS AMOSTRAIS	29
TABELA 3 - TEMPOS DE DESIDRATAÇÃO, DIAFANIZAÇÃO E BANHOS DE PARAFINA	33
TABELA 4 - LIMITES MÍNIMOS E MÁXIMOS PARA ÁREA VERMELHA NAS MARCAÇÕES DE TRICROMO MASSON E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA COLÁGENO.	36
TABELA 5 - LIMITES MÍNIMOS E MÁXIMOS PARA ÁREA AZUL NAS MARCAÇÕES DE TRICROMO MASSON E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA COLÁGENO.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura	Significado
ANOVA	Análise de Variância
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Dox livre	Cloridrato de Doxorrubicina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
H&E	Hematoxilina e Eosina
INC	Instituto Nacional do Câncer - EUA
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LOS	Losartana
MEC	Matriz Extracelular
NE	Nanoemulsão
NE-DOX	Nanoemulsão associada à Doxorrubicina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Saline Buffer</i> – Tampão Fosfato Salino

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Câncer	14
2.1.1 Aspectos gerais	14
2.1.2 Epidemiologia do câncer	15
2.2 Câncer de mama	15
2.3 Matriz extracelular (MEC)	16
2.3.1 Aspectos gerais	16
2.3.2 Matriz Extracelular e o câncer	18
2.4 Colágeno	19
2.4.1 Aspectos gerais	19
2.4.2 Colágeno e o Câncer	21
2.5 Losartana potássica	22
2.5.1 Losartana e o Câncer	22
2.6 Doxorrubicina e a nanotecnologia	23
2.6.1 Aspectos Gerais	23
2.6.2 Nanoemulsões	24
3. JUSTIFICATIVA	26
4. OBJETIVOS	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 Material	28
5.2 Delineamento Experimental	29
5.3 Experimentação <i>in vivo</i>	30
5.3.1 Manutenção dos animais	30
5.3.2 Cultivo de Células	30
5.3.3 Enxerto tumoral	30
5.3.4 Nanoemulsão associada à doxorrubicina	31
5.3.6 Estudos de eficácia	31
5.3.4.1 Avaliação clínica	32
5.3.4.3 Registro fotográfico	32
5.3.4.5 Avaliação pós-eutanásia de órgãos	32
5.3.4.7 Processamento Histológico	33
5.3.4.8 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> – ELISA	34
5.3.4.9 Imunohistoquímica	35
5.3.4.10 Análises estatísticas	35

5.3.4.11	Quantificações de áreas de colágeno marcadas com tricromo Masson e imunohistoquímica realizadas com software Image J®	36
6.	RESULTADOS	37
6.1	Variação do peso dos camundongos.....	37
6.2	Variação volume tumoral.....	38
6.3	Registro fotográfico durante tratamento.....	40
6.4	Sobrevivência	43
6.6	Peso Pulmonar	44
6.7	Número de nódulos pulmonares macroscópicos	45
6.8	Peso do coração.....	46
6.9	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay – ELISA</i>	47
6.10	Histologia do tecido pulmonar.....	49
7.	DISCUSSÃO	59
8.	CONCLUSÃO	66
	ANEXO	71
	Declaração do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA).....	71

1. INTRODUÇÃO

A matriz extracelular é um dos principais componentes do microambiente tecidual e apresenta diferentes propriedades físicas, químicas e biomecânicas que são essenciais para o desenvolvimento de suas funções em cada tipo de tecido. Apesar de funcionalmente e estruturalmente anormais, tumores sólidos assemelham-se a órgãos quando se trata da interação com o microambiente onde se encontram, portanto também possuem matriz extracelular, mesmo que disfuncional. As proteínas mais abundantes encontradas na matriz extracelular são aquelas pertencentes à família de colágenos, assim, estes são os maiores constituintes de todos os tecidos conectivos no corpo humano, e apesar de terem como função principal a estruturação e sustento dos tecidos, suas funções não se limitam a isso. No caso do câncer de mama, a modificação mais observada relacionada ao colágeno é o aumento dos níveis de deposição deste na matriz extracelular. A conformação deste colágeno é rígida, empacotada e alinhada, diferente da conformação de rede aleatória vista em tecidos epiteliais saudáveis. Essa diferente conformação do colágeno na matriz extracelular facilita a extravasamento das células e proliferação nos vasos, especialmente porque as vias de produção de colágeno também promovem a ativação de produção de proteinases que degradam a matriz extracelular, facilitando a disseminação das células cancerosas para tecidos secundários.

Por ano são gastos U\$ 1,16 trilhões de dólares no tratamento do câncer no mundo, nos quais os tratamentos padrões consistem na cirurgia para remoção do tumor *in situ* e de tecidos adjacentes, como os linfonodos, consistem ainda na radioterapia, nos quais raios-x de alta energia ou outros tipos de radiação são utilizados para matar as células cancerosas ou impedir que elas continuem a se proliferar e, no tratamento mais comum, quimioterapia, no qual fármacos são utilizados para eliminar ou cessar a proliferação das células cancerosas. No entanto, as terapias atuais têm se mostrado pouco eficazes e acabam tornando-se paliativas devidos aos diversos subtipos de câncer e suas diferentes respostas aos tratamentos. Além de apresentarem altos efeitos adversos para o paciente, como enjoos, perda de cabelos, apatia, dores, mal-estar e falta de apetite por atuarem em todas as células do corpo indistintamente. Dessa forma, torna-se extremamente necessário o desenvolvimento de novas abordagens no tratamento do câncer, que apresentem

como alvo especificamente os tecidos cancerosos, assim aumentando a eficácia do tratamento e melhorando a qualidade de vida do paciente.

No intuito de promover o incremento do tratamento, a nanotecnologia é uma abordagem que tem sido extensamente utilizada por suas características manipuláveis e funcionalizáveis. No presente trabalho foi utilizado um nanossistema para carreamento do quimioterápico doxorubicina e administração simultânea de losartana potássica, fármaco utilizado atualmente para o tratamento de patologias associados à pressão arterial, principalmente com o intuito de diminuir o grau de metástases em tecidos secundários, o que foi embasado em literatura científica exposta no Referencial Teórico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer

2.1.1 Aspectos gerais

Câncer é a denominação dada a um conjunto de doenças causadas por alterações funcionais celulares e caracterizada pela presença de um tumor dito maligno devido a sua capacidade de invadir e colonizar tecidos diferentes daqueles onde está primariamente localizado (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Diferentemente do acreditava-se, as massas tumorais não são apenas um nicho de proliferação celular desordenado, mas sim tecidos complexos formados por células distintas que participam de interações entre si, existindo ainda células que são recrutadas a esse ambiente tumoral e que exercem função de estroma associado ao tumor, que também possui papel decisivo na progressão e sucesso da doença (KLEINMAN, 2003).

Para que as células tumorais obtenham sucesso em sua jornada de sobrevivência e colonização seis características devem ser adquiridas. As células cancerosas deverão ser capazes de: (1) proliferar-se infinitamente; (2) induzir a angiogênese; (3) evadir mecanismos de morte celular; (4) sustentar vias de sinalização favoráveis à sua proliferação; (5) evadir fatores de crescimento que regulam negativamente a proliferação celular e (6) serem capazes de invadir e colonizar tecidos secundários (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Para que cada uma dessas características seja adquirida, as células cancerosas passam por inúmeras alterações que podem ser decorrentes de fatores intrínsecos e extrínsecos e, apesar da alta incidência do câncer, o processo para aquisição dessas características é um processo complexo (EGEBLAD *et al.*, 2008).

Atualmente, as terapias para o tratamento do câncer são a cirurgia de remoção dos tumores e de seus tecidos adjacentes (quando possível), quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia e terapias imunológicas que não raramente culminam na reincidência do câncer (SANDOO, KITAS e CARMICHAEL, 2015).

2.2 Epidemiologia do câncer

Estimativas apontam que cerca de um quinto da população humana morrerá de câncer (HANAHAN e WEINBERG, 2011) e, segundo dados apresentados pela Organização Mundial de Saúde, 8.8 milhões de pessoas morreram de câncer em todo o mundo no ano de 2015, sendo a doença considerada a segunda principal causa de morte no planeta. Por ano são gastos U\$ 1,16 trilhões de dólares no tratamento da doença, cuja prevenção pode e deve ser feita por meio do aumento da qualidade de vida com exercícios, alimentação Sadio, evitando o abuso de álcool, tabaco e realizando os exames de rotina que permitam a identificação precoce da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018).

2.3 Câncer de mama

Das 8,8 milhões de mortes mencionadas anteriormente, 571.000 são atribuídas ao câncer de mama, fazendo com que este seja o 5º tipo de câncer mais comum no planeta entre as mulheres (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018).

No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) o câncer de mama é o segundo mais comum entre pessoas do sexo feminino, sendo responsável por 28% dos casos de câncer no país. Em 2016 surgiram 57.960 novos casos de câncer de mama no Brasil e que 14.388 mortes foram atribuídas à doença.

De acordo com o INCA o câncer de mama é definido como a formação de células malignas em tecidos mamários. A mama é composta por lobos e ductos, e cada mama possui entre 15 e 20 lobos. Cada um desses lobos possui ramificações menores denominadas de lóbulos que, por sua vez, se ramificam em dezenas de bulbos que podem vir a produzir leite. Os lobos e lóbulos estão ligados por pequenos tubos denominados ductos. Além dessas estruturas, cada mama possui também vasos sanguíneos e vasos linfáticos, sendo os últimos denominados assim por transportarem linfa entre os linfonodos, que são encontrados por todo o corpo e responsáveis por drenar substâncias na linfa e por combater doenças e infecções. Aglomerados de linfonodos são encontrados perto da mama, debaixo da axila, na região superior à clavícula e no tórax. Por estarem tão próximos da mama, os linfonodos acabam sendo uma via de disseminação de células cancerosas malignas

para tecidos distantes, estando quase sempre associada à disseminação das células para outros órgãos, como pulmão e ossos.

Os fatores de risco associados ao câncer de mama são diversos, e é possível citar principalmente o histórico familiar da doença, a exposição desregulada ao estrógeno, reposição de hormônios durante a menopausa, ingestão de álcool, obesidade e idade avançada (ANOTHAISINTAWEE *et al.*, 2014).

Atualmente os tratamentos para o câncer de mama são variados. Os tratamentos padrão consistem na cirurgia para remoção do tumor *in situ* e de tecidos adjacentes, como os linfonodos, na radioterapia, nos quais raios-x de alta energia ou outros tipos de radiação são utilizados para matar as células cancerosas ou impedi-las de continuarem a se proliferarem e, a mais comum, quimioterapia, na qual fármacos são utilizadas para matar ou cessar a proliferação das células cancerosas (MILLER *et al.*, 2016). No entanto, essas terapias são pouco eficazes e acabam tornando-se paliativas devido aos diversos subtipos de câncer e suas diferentes respostas aos tratamentos, além de apresentarem altos efeitos adversos para o paciente, como enjoos, perda de cabelos, apatia, dores, mal-estar e falta de apetite por afetarem todas as células do corpo indistintamente. Dessa forma, torna-se extremamente necessário o desenvolvimento de novas abordagens no tratamento do câncer, que apresentem como alvo especificamente as células cancerosas, assim aumentando a eficácia do tratamento e melhorando a qualidade de vida do paciente.

2.4 Matriz extracelular (MEC)

2.4.1 Aspectos gerais

Um dos principais componentes do microambiente tecidual é a matriz extracelular, uma rede complexa e emaranhada de macromoléculas como proteínas, glicoproteínas, proteoglicanas e polissacarídeos com diferentes propriedades físicas e bioquímicas (LU, WEAVER e WERB, 2012). As células constituintes da matriz são as responsáveis pela secreção das macromoléculas presentes na mesma. A matriz extracelular é composta por três principais tipos de moléculas: glicosaminoglicanos, proteínas fibrosas e glicoproteínas não fibrosas, das quais as mais comuns são as proteínas fibrosas, sendo representadas principalmente pelo colágeno. As moléculas

ativas da matriz extracelular contêm múltiplos sítios ativos, geralmente para diferentes atividades e que interagem com diferentes receptores, fazendo com que a matriz extracelular possua funções essenciais, que variam da separação do tecido epitelial do tecido endotelial ou do estroma, sustentação, manutenção e nutrição à sua junção com células para formação de tecidos. Ainda, influencia de forma determinante nos comportamentos celulares, como a diferenciação, proliferação, morfologia, sobrevivência, polaridade e migração (KLEINMAN, 2003; HYNES, 2009; EGEBLAD, NAKASONE e WERB, 2010; KUZET e GAGGIOLI, 2016).

As diferentes propriedades físicas, bioquímicas e biomecânicas apresentadas pela matriz extracelular para cada tipo de tecido, são essenciais para o desenvolvimento de suas funções em um microambiente. As propriedades físicas referem-se à insolubilidade, porosidade, organização espacial e orientação, sendo responsável pelo desempenho de funções básicas como o sustento tecidual, servindo como barreira e sendo sítio de ancoragem. Além disso, a orientação da matriz extracelular influencia a migração celular por se relacionar com a adesão de integrinas à superfície (LOPEZ, MOUW e WEAVER, 2008; LU, WEAVER e WERB, 2012). Propriedades bioquímicas estão relacionadas à capacidade de sinalização da matriz extracelular, estando diretamente relacionadas à sensibilidade e interação celular com o microambiente por meio de cascatas sinalizadoras que vão da superfície celular ao núcleo, resultando em alterações ou manutenção de padrões de expressão gênica ou do comportamento celular (HYNES, 2009). A arquitetura fibrosa rica em colágeno da matriz extracelular é responsável por suas características biomecânicas, que dizem respeito à rigidez e elasticidade da matriz e relacionam-se com a percepção celular de forças externas e com a resistência a estresses tensionais, além de também influenciar aspectos essenciais do comportamento celular (BADYLAK, 2007; GEHLER, *et al.*, 2009).

Quando em pleno desenvolvimento de suas funções estruturais e biológicas, a matriz extracelular age como estrutura de suporte, é resistente à tensão, serve como conector entre diferentes tecidos, é um reservatório de fatores de crescimento como quimiocinas e citocinas, é altamente dinâmica, regula a homeostase tecidual, o desenvolvimento de tecidos e órgãos, sua organização, diferenciação, morfogênese, o processo de inflamação e doenças, polaridade e adesão celular (FRANTZ, STEWART e WEAVER, 2010; GILKES, SEMENZA e WIRTZ, 2014).

A diferenciação de células-tronco, por exemplo, é altamente regulada por componentes e fatores de crescimento secretados pela matriz extracelular, assim como a morfogênese vascular, onde componentes da matriz extracelular interagem com células endoteliais para promover a migração, proliferação e formar estruturas tubulares tridimensionais (KLEINMAN, 2003). No entanto, em microambientes tumorais, a matriz extracelular sofre alterações e passa a expressar padrões que impedem o desenvolvimento apropriado de suas funções, influenciando de forma decisiva o desenvolvimento e progressão do câncer.

2.4.2 Matriz Extracelular e o câncer

Por influenciar diretamente o comportamento celular, alterações em propriedades físicas, bioquímicas e biomecânicas da matriz extracelular culminam na modificação de sua regulação e dinâmica, influenciando seu padrão de comportamento. Apesar de funcionalmente e estruturalmente anormais, tumores sólidos assemelham-se a órgãos quando se trata de sua interação com o microambiente onde se encontram, apresentando diversos tipos celulares, como células dendríticas, fibroblastos, linfócitos, e outras células mielóides, e é essa relação sistêmica que dirige seu desenvolvimento e progressão a metástase (EGEBLAD *et al.*, 2008; EGEHLAD, NAKASONE e WERB, 2010). O estroma, onde está inserida a matriz extracelular, é composto principalmente por três tipos celulares: células mesenquimais, células do sistema vascular e células do sistema imune, que sofrem alterações morfológicas severas em um processo tumoral (BARKAN, GREEN e CHAMBERS, 2010).

Nos tecidos conjuntivos do microambiente tumoral encontram-se os vasos sanguíneos responsáveis pelo transporte de oxigênio e nutrientes que mantêm todas as células. Fibroblastos, células cartilagosas e ósseas são todos especializados na deposição de matriz extracelular rica em colágeno. Os fibroblastos encontram-se dispersos na matriz extracelular do tecido conjuntivo, sendo responsáveis pela síntese e deposição dos diferentes tipos de colágeno e pela produção de metaloproteinasas de matriz (MMPs), responsáveis pela constante remodelação da matriz extracelular (KALLURI e ZEISBERG, 2006). Ao longo da vida desempenham diversos papéis na formação de tecidos: durante o período embrionário encontram-se envolvidos no

crosstalk (capacidade de uma via de transdução influencia outra) entre células epiteliais e mesenquimais, auxiliando na modelação de órgãos, na fase adulta são majoritariamente responsáveis por depositar matriz extracelular no processo de inflamação e cicatrização (EGEBLAD, NAKASONE e WERB, 2010). Em um tumor, os fibroblastos presentes são chamados de CAFs (do inglês *cancer associated fibroblasts*). No câncer de mama, foco deste trabalho, cerca de 80% dos fibroblastos adquirem o fenótipo de CAFs, sendo esta transformação induzida e ativada pelo Fator de Transformação de Crescimento β (TGF- β), secretado por células tumorais, culminando em um ciclo vicioso de super-ativação e super-expressão, já que os fibroblastos também passam a elevar os níveis de secreção do TGF- β , sendo importante ressaltar que os elevados níveis de expressão desse fator de transformação de crescimento estão diretamente ligados à progressão do câncer. Como a função majoritária dos fibroblastos é a deposição de colágeno na matriz extracelular, os níveis aumentados observados de colágeno alterado depositado na matriz extracelular é uma das principais alterações encontrada na mesma, sendo a essa alteração atribuída um papel de protagonismo no processo do surgimento de metástases em sítios secundários (AKHURST, 2002; KALLURI e ZEISBERG, 2006; PROVENZANO *et al.*, 2006; GILKES, SEMENZA e WIRTZ, 2014; COX *et al.*, 2015)

2.5 Colágeno

2.5.1 Aspectos gerais

Como anteriormente mencionado, as proteínas mais abundantes encontradas na matriz extracelular são aquelas pertencentes à família de colágenos, assim, estes são os maiores constituintes de todo os tecidos conectivos no corpo humano, e apesar de terem como função principal a estruturação e sustento dos tecidos, suas funções não se limitam a isso. Colágenos são constituídos por proteínas fibrosas, e são caracterizados por sua estrutura típica de fita tripla-helicoidal, onde três cadeias polipeptídicas de colágeno, denominadas cadeias- α , se emaranham como uma corda. Os diferentes tipos de colágeno são divididos principalmente em colágenos formadores de fibrilas, colágenos de membrana basal e colágeno microfibrilares. São ricos em prolina e glicina, essenciais para formação da hélice de três fitas. Hoje, sabe-

se que há uma miríade de colágenos encontrados nos tecidos humanos (GELSE, PÖSCHL e AIGNER, 2003).

O colágeno do tipo I, da classe de colágenos fibrilares, é o mais abundante no corpo humano, estando presente em tecidos epiteliais, nos ossos, tendões, ligamentos, córneas e tecidos conectivos intersticiais. Nos tendões e em ligamentos, o colágeno é responsável por transmitir a força dos músculos aos ossos e por armazenar energia elástica (FRATZL, 2008).

As moléculas de colágeno do tipo IV, que está inclusa no grupo de colágenos associados a fibrilas, são constituintes exclusivos da membrana basal, uma espécie de matriz extracelular especializada. O colágeno do tipo IV é mais longo que os formadores de fibrilas e é também conhecido como colágeno formador de rede, possui 6 cadeias- α distintas que apresentam três domínios estruturais diferentes, onde os domínios amino-terminais ricos em resíduos de cisteína e lisina são essenciais para o processo de *crosslinking* (interação entre as moléculas das cadeias) entre cadeias de quatro moléculas tripla-hélice, processo que é responsável pela resistência do colágeno do tipo IV a colagenases. Quando secretadas na matriz extracelular, as moléculas tripla-hélice se associam para formar redes distintas que servem como um esqueleto para interação e ancoragem com outros componentes da MEC, como lamininas e proteoglicanas (KHOSHNOODI, PEDCHENKO e HUDSON, 2008). As propriedades mecânicas de tecidos colagenosos dependem da formação de *crosslinkings* intermoleculares entre as moléculas de colágeno. Apesar desses *crosslinkings* promoverem diferentes tipos de organização espacial das fibras de colágenos, o processo de *crosslinking* dos diferentes tipos de colágeno é o mesmo. Em tendões, por exemplo, essas fibras se encontram dispostas paralelas umas às outras, conferindo maior força longitudinal. Em tecidos epiteliais essa organização é feita em camadas aleatórias, promovendo uma conformidade estrutural maior.

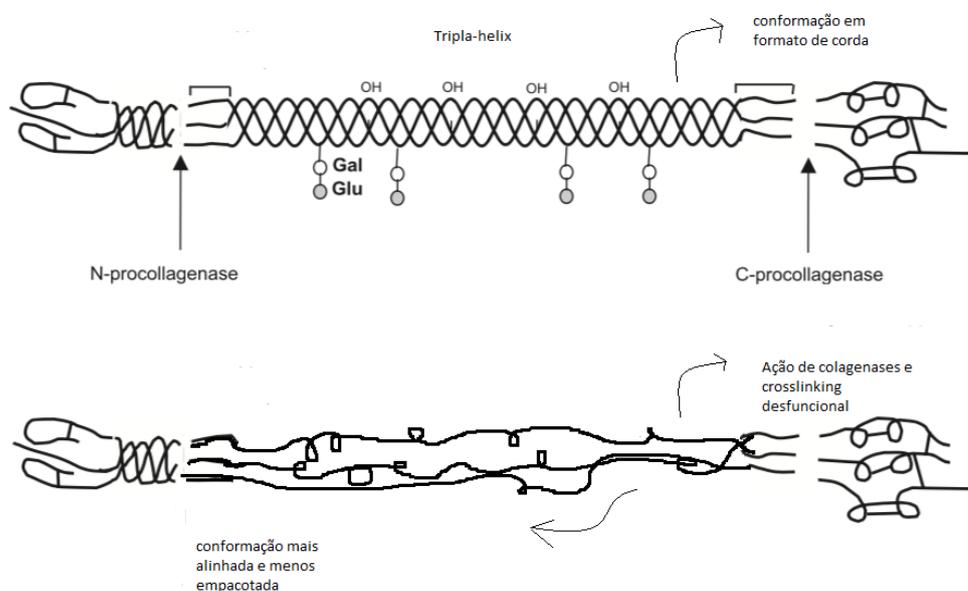
O processo de *crosslinking* acontece em duas etapas, cada uma com um objetivo principal. A primeira consiste em dar o melhor funcionamento tecidual possível, e é mediada por enzimas que formam *crosslinkings* entre sítios específicos, ligando a “cabeça” da molécula ao seu final, formando uma rede dentro da fibra. O segundo processo faz com que as moléculas se tornem mais rígidas e quebradiças, se diferenciando por não depender de enzimas, tratando-se de reações que acontecem entre a glicose e seus produtos para formar *crosslinking* intermoleculares

por meio da ligação dos resíduos de arginina e lisina da região tripla-hélice da molécula. As enzimas responsáveis pelo processo de *crosslinking* dos colágenos são as lisil-oxidases, que desaminam de forma oxidativa os grupos amino de resíduos específicos de lisina (COX *et al.*, 2015)

2.5.2 Colágeno e o Câncer

Sendo os maiores constituintes da matriz extracelular, espera-se que o colágeno desempenhe funções cruciais na manutenção adequada dos tecidos. Dessa forma, quando em níveis desregulados, alterações proeminentes são observadas e estão geralmente associadas a diferentes tipos de doenças (GELSE, PÖSCHL e AIGNER, 2003). No caso do câncer de mama, a modificação mais observada relacionada ao colágeno é o aumento dos níveis de deposição deste na matriz extracelular. Além disso, o colágeno depositado apresenta uma conformação diferente daquela observada em colágenos de tecido saudáveis, estando mais rígido, empacotado e alinhado, diferente da conformação de rede aleatória vista em tecidos epiteliais saudáveis (GOA e WAGSTAFF, 1996). A diferente conformação do colágeno na matriz extracelular (Fig. 1) facilita a extravasamento das células e chegada nos vasos, especialmente porque as vias de produção de colágeno também promovem a ativação de produção de proteinases que degradam a matriz extracelular (GILKES, SEMENZA e WIRTZ, 2014; EGEBLAD *et al.*, 2008). Ainda, teorias buscam explicar o comportamento de tecidos secundários na presença de células cancerosas. Estudos recentes mostram que a teoria da semente e do solo está relacionada ao remodelamento de componentes da matriz extracelular, como o colágeno, uma vez que ao chegarem nos sítios secundários as células cancerosas tendem a recrutar diversos tipos celulares para conseguirem modificar e colonizar o tecido em que se encontram (FANG *et al.*, 2014; KUZET e GAGGIOLI, 2016).

Figura 1 - Diferentes conformações do colágeno. A. colágeno funcional em tecidos saudáveis. B. colágeno descompactado, alinhado encontrado em tecidos tumorais.



Fonte: Adaptada de Gelse et al, 2003.

2.6 Losartana potássica

2.6.1 Losartana e o Câncer

A losartana potássica é um fármaco que foi lançado no mercado farmacêutico na década de 90, sendo a primeira de um novo grupo para tratamento de hipertensão: ela é antagonista de angiotensina do tipo II, que é responsável pela constrição de vasos sanguíneos. Assim, se liga seletivamente e competitivamente ao receptor AT1 da angiotensina II, impedindo que ela se ligue ao receptor e, portanto, bloqueando todos os efeitos fisiológicos associados à angiotensina II. Dessa forma, ela vem sendo utilizada desde então no tratamento para hipertensão (GOA e WAGSTAFF, 1996; SICA, GEHR e GHOSH, 2005). No entanto, ao longo dos anos foi observado que os efeitos da administração da losartana poderiam ajudar no tratamento de outras doenças, como a Síndrome de Marfan e o tratamento da proteinúria na Síndrome de Alport (CHEN *et al.*, 2015), enquanto estudos recentes têm mostrado o potencial da losartana em descomprimir os vasos que circundam os tecidos tumorais, uma vez que eles se encontram comprimidos não só pela pressão positiva exercida na região, mas

também pela ativação de fatores vasocompressores, como a Trombospondina-1 (TSP-1), (DIOP-FRIMPONG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2016), que se soma ao estado de desorganização da matriz extracelular, tornando a chegada de fármacos e oxigênio no microambiente tumoral ineficiente. O acúmulo desse estresse sólido termina por colabar os vasos sanguíneos da região, dificultando mais ainda a oxigenação da área. Pacientes com baixa perfusão tumoral apresentam pouca resposta à quimioterapia, possivelmente porque há baixa permeabilidade do fármaco na região (CHAUHAN *et al.*, 2013). Alguns estudos mostram o efeito do uso de Losartana em facilitar a chegada de fármacos e oxigênio ao microambiente tumoral, já que o antagonista do receptor de angiotensina II também afeta as vias de sinalização de TGF- β , que está diretamente envolvido na produção de Colágeno por Fibroblastos Associados ao Câncer (CAFs) e em tecidos funcionais age como importante regulador do desenvolvimento e função da glândula mamária. Neste caso, a Losartana pode ser utilizada como meio de promover a desativação ou inibição dessa via, inibindo a ativação do TGF- β 1 por meio da inibição da Trombospondina 1, pelo qual a losartana também possui afinidade, diminuindo a produção e deposição de colágeno na matriz extracelular, conseqüentemente diminuindo o estresse sólido no microambiente tumoral (AKHURST, 2002; DIOP-FRIMPONG *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012).

2.7 Doxorrubicina e a nanotecnologia

2.7.1 Aspectos Gerais

Fármacos quimioterápicos podem ser divididos em diferentes grupos, geralmente baseados em sua composição química ou função. A doxorrubicina compõe o grupo de Classe I das Antraciclinas, o que significa que ela se intercala nos pares de bases do DNA, inibindo a ação de enzimas DNA polimerase e RNA polimerase, cessando a replicação do DNA e transcrição do RNA. A doxorrubicina também age inibindo os efeitos de enzimas como a topoisomerase e ativando mecanismos de reparo celular, que não conseguem ser executadas e culminam na morte celular. Outro modo de ação da doxorrubicina é a geração de Radicais Livres intracelulares, que causa dano ao DNA e conseqüente inibição de moléculas

necessárias para o ciclo celular funcional. Ainda, a doxorrubicina pode se ligar diretamente a proteínas do plasma, gerando interações enzimáticas que reduzem a doxorrubicina e geram radicais livres que são altamente reativos (TACAR, SRIAMORNSAK e DASS, 2012).

Apesar de ser um fármaco altamente eficaz e com vários mecanismos de ação, é altamente tóxica para todos os órgãos, em especial ao coração. Por não ser um fármaco seletivo, significando que ele age independente da célula ser ou não cancerosa, e por produzir radicais livres que são nocivos a todas as células, a doxorrubicina apresenta alta toxicidade ao paciente. O maior problema associado ao seu uso é cardiotoxicidade, mas este não é o único. A doxorrubicina também é altamente tóxica para o cérebro e fígado (GABIZON, SHMEEDA e BARENHOLZ, 2003). Fármacos administradas sistemicamente, de modo a serem eficazes, devem (1) chegar a diferentes áreas do tumor por meio da vascularização, (2) atravessar as paredes dos vasos e (3) finalmente se difundir por meio do espaço intersticial para alcançar as células cancerosas. Essas etapas dificilmente conseguem ser completadas com sucesso por causa da complexa rede de matriz extracelular e do estresse presente no microambiente tumoral (LIU *et al.*, 2012), e este é um dos motivos pelos quais as terapias disponíveis atualmente são tão pouco eficazes no tratamento de metástases, já que o microambiente tumoral é tão diferenciado que não permite que a fármaco se difunda satisfatoriamente pelo tecido tumoral. Com o objetivo de transpor essas barreiras no tratamento, nanossistemas são pensados e associados a terapias simultâneas que permitam o transporte do fármaco de forma mais eficiente, como a Losartana, que diminui o nível de vasoconstrição da região e permite o carreamento de fármacos até essas regiões de forma mais eficaz do que a observada em fármacos usuais (BHUSHAN, 2017).

2.7.2 Nanoemulsões

Um dos grupos de nanossistemas que possui grande apelo na área da saúde são as nanoemulsões, que são partículas que podem ser utilizadas como carreadoras de fármacos e outras substâncias. São dispersões coloidais que podem ser óleo-em-água ou água-em-óleo, que são estabilizadas com a ajuda de um tensoativo e geralmente encontram-se em uma variação de tamanho entre 50nm e 1000nm. O seu

núcleo pode ser hidrofílico ou hidrofóbico, assim como sua interface (SHAH, BHALODIA e SHELAT, 2010). As grandes vantagens da utilização de nanoemulsões são as de que sua produção é algo que, geralmente, não possui altos custos e pode ser feita com facilidade e reprodutibilidade (MASON *et al.*, 2006; CÂMARA *et al.*, 2017; GANASSIN *et al.*, 2018), além do efeito do efeito aprimorado de retenção e permeabilidade (EPR), fenômeno associado à anatomia dos tumores sólidos, onde os vasos responsáveis pela nutrição e oxigenação na área apresentam fenestras que facilitariam a chegada e acumulação de fármacos de determinado tamanho e composição na região tumoral (Maeda *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2010; Torchilin, 2010). No presente trabalho, as nanoemulsões foram utilizadas para carrear a Doxorubicina, cuja forma lipossomal possui preços elevados e é de difícil acesso no mercado brasileiro e ainda apresenta efeitos adversos, como a Síndrome Palmo-plantar, responsável pela descamação de extremidades do corpo causada pelos componentes da fármaco Doxil®, e da doxorubicina em sua forma livre, que é altamente tóxica e amplamente utilizada graças a seu menor custo (BARENHOLZ, 2012). Ainda, dados obtidos em 2017 por este grupo de pesquisa corroboram com a eficácia da doxorubicina carregada pela nanoemulsão na terapia de camundongos enxertados com células tumorais (CÂMARA *et al.*, 2017)

3. JUSTIFICATIVA

O prognóstico de pacientes diagnosticados com tumores de mama correlaciona-se com o estágio de progressão da doença, destacando-se as metástases locais e distantes como fatores de prognósticos desfavoráveis. A nanotecnologia tem sido utilizada com sucesso para a melhora dos índices terapêuticos, bem como dos prognósticos clínicos, de quimioterápicos tradicionais como a doxorrubicina. Ademais, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a doxorrubicina associada a nanoestruturas lipídicas foi eficaz na redução de metástases pulmonares em modelos tumorais de câncer de mama em camundongo (LONGO *et al.*, 2015; CÂMARA *et al.* 2017,), onde foi observado a mudança na concentração de colágeno nos tecidos de pulmões metastáticos em ensaio de imunohistoquímica que fundamentou trabalhos que relacionam o colágeno com o desenvolvimento e progressão de metástases (CARDADOR *et al.*, 2017). Portanto, esse trabalho se justifica como meio para a análise e entendimento da relação do colágeno e da matriz extracelular em modelos de tumor de mama em camundongos após o tratamento com doxorrubicina associada à nanoemulsões e administração simultânea de Losartana.

4. OBJETIVOS

- 4.1 Avaliar a atividade antitumoral da doxorubicina associada à nanoemulsões e administração simultânea da losartana em modelos de tumor mamário em camundongos BalbC fêmeas;
- 4.2 Avaliar a presença de metástases pulmonares em modelos de tumor de mama em camundongos após o tratamento com doxorubicina associada à nanoemulsões e administração simultânea da losartana;
- 4.3 Avaliar a toxicidade do tratamento com Ne-Dox em modelos de tumor de mama em camundongos;
- 4.4 Avaliar os níveis de TGF- β , GM-CSF e colágeno em material biológico *ex-vivo* de camundongos BalbC fêmeas após o tratamento com doxorubicina associada à nanoemulsões e administração simultânea da losartana.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

O material utilizado para realização dos experimentos do presente trabalho encontra-se descrito na tabela abaixo, com nome e fabricante.

Tabela 1 - Lista de material utilizado na experimentação do trabalho

Material/reagente	Fabricante/PAÍS
Doxorrubicina	SIGMA, EUA
Critoubos	TPP, ALE
Ketamina	Agener União, BRA
Lamínula	Perfecta, BRA
DMEM	Invitrogen, EUA
Parafina	Vtec, BRA
Paraformaldeído 4%	Vtec, BRA
Tubos falcon	TPP, ALE
Xilazina	Agener União, BRA
Etanol 980GL	SIGMA ALDRICH, EUA
Losartana	SIGMA ALDRICH, EUA
Kit ELISA TGF-β	THERMOFISHER, EUA
Kit ELISA GM-CSF	THERMOFISHER, EUA
Células 4T1	ATCC
PBS	LABORCLIN, BRA
Paquímetro automático	KING TOOLS
Tubos separadores para soro	THERMOFISHER, EUA
Seringas de insulina	BD EXPERIENCE, BRA

5.2 Delineamento Experimental

O presente trabalho teve como base as etapas metodológicas representadas na figura 2. Nela estão exemplificadas as etapas realizadas:

1. Enxerto tumoral subcutâneo no flanco traseiro esquerdo;
2. Avaliação da eficácia do tratamento dos grupos experimentais, expostos na tabela 2.
3. Avaliação clínica dos camundongos durante o tratamento;
4. Avaliação *ex-vivo* dos tecidos pulmonares e soro dos camundongos.

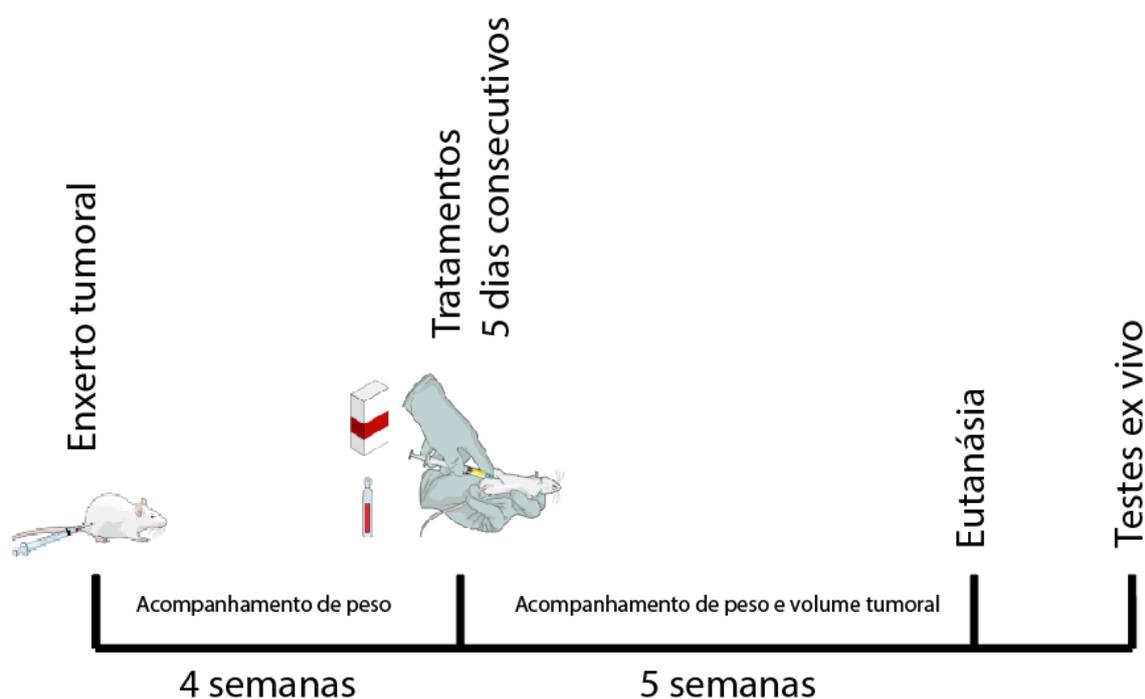


Figura 2 - Delineamento experimental

Tabela 2 - Grupos de tratamento, doses e números amostrais

Grupo de tratamento	Dose de tratamento	Número de animais
Dox livre	20mg/kg	5
Dox livre + Los	20mg/kg + 40mg/kg	5
NeDox	40mg/kg	5
NeDox + Los	40mg/kg + 40mg/kg	5
PBS	-	5

5.3 Experimentação *in vivo*

5.3.1 Manutenção dos animais

Os camundongos BalbC fêmeas utilizados neste trabalho foram obtidos do Biotério da Universidade Católica de Brasília – UCB. Os animais possuíam 6 semanas de idade e apresentavam uma faixa de peso entre 20g-23g. Foram mantidos no Biotério do Departamento de Genética e Morfologia (Instituto de Ciências Biológicas), UnB, durante todo o período de experimentação. No biotério, os camundongos foram alojados em gaiolas com 5 (cinco) animais cada, forradas com maravalha e mantidas em prateleiras ventiladas com sistema de filtração de ar. Foram mantidos em condições ambientes controladas, com temperatura a 22°C, umidade entre 50% e 100%, ciclo circadiano de 12 horas claro/escuro automatizado. Alimentação e fornecimento de água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais realizados nos camundongos foram autorizados pelo Comitê de Ética no Uso Animal – CEUA da Universidade de Brasília, Protocolo 24/2018, Anexo I.

5.3.2 Cultivo de Células

As células 4T1 utilizadas neste experimento são do estoque de células do Laboratório de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília que foram transformadas para apresentarem bioluminescência na presença da enzima luciferase. Foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Ao atingirem 80% de confluência, as células foram ressuspensas com 1,5ml de tripsina e centrifugadas. Após a centrifugação a tripsina foi descartada, e novo DMEM foi adicionado como meio para o enxerto tumoral.

5.3.3 Enxerto tumoral

Antes do procedimento de enxerto de células, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 80µL de volume total de solução de cloridrato de cetamina a 10% com cloridrato de xilazina a 2%, 80mg/kg e 10mg/kg, respectivamente. Após a anestesia, os camundongos receberam o enxerto subcutâneo no flanco esquerdo de células de adenocarcinoma mamário murino 4T1 na concentração de 4x10⁴ células/50µL de meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM).

5.3.4 Nanoemulsão associada à doxorrubicina

A nanoemulsão associada a doxorrubicina, neste trabalho apresentada como NeDox e NeDox associada à losartana, foi gentilmente cedida pela mestrandia Marina Arantes Radicchi para realização dos experimentos. Consistem em Os ensaios citotóxicos da nanoemulsão foram realizados em trabalho de Iniciação Científica, apresentados em congresso (PORTELLA *et al.*, 2017), e as doses para testes *in vivo* aqui utilizadas foram anteriormente testadas em estudos pilotos, cujos resultados encontram-se em base de dados não publicados do grupo de pesquisa.

5.3.5 Losartana potássica

Embasado em trabalhos anteriores (DIOP-FRIMPONG *et al.*, 2011; GAOA *et al.*, 2011), o presente trabalho associou a administração intraperitoneal de losartana ao tratamento com nanoemulsões contendo doxorrubicina e ao tratamento com a doxorrubicina em sua forma livre para efeitos de comparação. A administração simultânea de losartana foi feita durante o mesmo período de administração dos grupos de tratamento Dox livre, Dox livre + los, NeDox e NeDox + Los, tendo sido administrados 100µL por animal, a 40mg/kg, por via intraperitoneal, totalizando cinco adiminstrações diárias consecutivas.

5.3.6 Estudos de eficácia

Após quatro semanas do enxerto, foi possível verificar o surgimento de tumores primários pela palpação, e medi-los subjetivamente com aproximadamente 2mm. O tratamento foi feito com os grupos apresentados na figura de delineamento experimental do teste de eficácia por via intraperitoneal durante cinco dias consecutivos, por via intraperitoneal, como protocolo estabelecido em (CÂMARA *et al.*, 2017), com doses de 100µL por animal e concentrações como exposto na Tabela 2.

5.3.4.1 Avaliação clínica

5.3.4.1 Acompanhamento do peso corporal

O peso corporal dos camundongos foi medido no dia anterior ao início do enxerto e em dias alternados até o dia da eutanásia, o que gerou um gráfico de peso.

5.3.4.2 Acompanhamento do volume tumoral *in vivo*

O volume tumoral começou a ser medido quando os tumores primários resultantes do enxerto no flanco esquerdo tornaram-se minimamente visíveis. A medição com paquímetro foi realizada em dias alternados até o dia da eutanásia. Os tumores foram medidos em ângulos verticais, o comprimento, tendo como ponto de orientação a cabeça do animal, e horizontais, a largura, tendo como ponto de orientação as patas traseiras. Para o cálculo do volume tumoral final, a seguinte equação (GANASSIN *et al.*, 2018) foi utilizada:

$$TV = \frac{4\pi}{3} \left(\frac{L + W}{2} \right)$$

5.3.4.3 Registro fotográfico

Os camundongos BalbC fêmeas tiveram acompanhamento fotográfico realizado ao longo de quatro das cinco semanas de tratamento. Nelas, fotos de perfil do lado esquerdo foram tiradas com uma câmera digital Canon T2i e lente de 50mm para observação do aspecto físico dos animais e dos tumores.

5.3.4.4 Curva de sobrevivência

Para a formação da curva de sobrevivência dos camundongos, todos os dias as gaiolas eram verificadas para determinar o estado físico/clínico dos animais. Caso um animal fosse encontrado morto, anotava-se o dia e a identificação do animal. Após a eutanásia, os dados foram agrupados e a curva de sobrevivência binária foi formada, resultado apresentado em forma de percentual.

5.3.4.5 Avaliação pós-eutanásia de órgãos

Imediatamente após a eutanásia por superdosagem de anestesia, o pulmão, tumor e coração foram pesados e os dados anotados na Ata de experimentos. Uma

vez coletados, os dados foram normalizados pelo peso de cada animal coletado no dia da eutanásia e posteriormente organizados em forma de gráfico de coluna.

5.3.4.6 Contagem de nódulos macroscópicos no pulmão

Os nódulos pulmonares visíveis a olho nu, ou seja, macroscópicos, foram contados em experimento simples-cego, onde o responsável pela contagem não sabia a que grupo de tratamento pertencia o pulmão, com lupa de aumento. Os pulmões utilizados já haviam sido fixados com paraformaldeído a 4% e estavam em solução de álcool 70%.

5.3.4.7 Processamento Histológico

Após a eutanásia os órgãos foram submergidos em paraformaldeído a 4% durante 24h. No dia seguinte, deu-se a passagem dos órgãos para solução de álcool 70%. Para o processamento histológico, banhos de quarenta minutos em diferentes concentrações de álcool e posteriormente de xilol e parafina foram realizados, como demonstrado na tabela abaixo:

Tabela 3 - Tempos de desidratação, diafanização e banhos de parafina

Solução	Tempo de exposição do órgão à solução
Álcool 70%	40 min
Álcool 80%	40 min
Álcool 90%	40 min
Álcool PA 1	40 min
Álcool PA 2	40 min
Álcool PA + xilol	40 min
Xilol 1	40 min
Xilol 2	40 min
Parafina 1	60 min
Parafina 2	60 min
Parafina 3	60 min

Após os banhos, os órgãos foram incluídos em paraplast e moldados em formas de inclusão, sendo posteriormente seccionados em cortes de 5 μ m de espessura, montados em lâminas de vidros e mantidas em estufa a 37°C para evitar enrugamento da amostra. Para coloração o processo de desidratação e diafanização foi realizado ao inverso, com tempos de um minuto. A coloração foi realizada em eosina e hematoxilina, como protocolo estabelecido no laboratório .

A coloração por tricromo Masson para marcação do colágeno foi realizada em colaboração, para isso cortes do órgão incluso em parafina foram montados em lâmina de acordo com protocolo estabelecido em (SUVIK e EFFENDY, 2012)

5.3.4.8 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* – ELISA

Para o ensaio de ELISA – TGF- β , o seguinte protocolo foi seguido:

1. 100 μ L/poço do anticorpo de captura diluído em tampão de coating 1X (fornecido com o kit), foram adicionados à placa de ELISA de 96 poços, fornecida com o kit. A placa foi selada e incubada durante a noite em refrigerador a 4°C;
2. O anticorpo de captura foi completamente removido com o auxílio de pipetas automáticas, e os poços lavados três vezes com 250 μ L de tampão fosfato salino (PBS) de lavagem, com incubação de um minuto do tampão a cada lavagem, de acordo com o manual;
3. Uma solução do diluente ELISA/ELISPOT 5x foi diluída em água destilada, e 200 μ L dessa solução foram adicionados a cada poço da placa e incubados em temperatura ambiente por uma hora;
4. A solução para formação da curva-padrão padrões foi diluída com o diluente ELISA/ELISPOT 1X (previamente diluído). Desta solução, 100 μ L foram adicionados aos poços. A partir deles uma diluição seriada foi realizada para obtenção da curva padrão. As amostras de soro dos animais foram adicionadas em seus respectivos poços, e a placa foi incubada durante a noite em refrigerador a 4°C;
5. O anticorpo de detecção foi diluído com o diluente ELISA/ELISPOT, e da solução final 100 μ L foram adicionados a cada poço com amostras, incluindo as

- da curva padrão. A placa foi incubada durante uma hora em temperatura ambiente;
6. Os poços foram aspirados e lavados por três vezes;
 7. Após o período de incubação, 100 μ L da enzima Avidin-HRP foram adicionados aos poços, e a placa novamente incubada em temperatura ambiente durante trinta minutos;
 8. A solução foi removida dos poços, que foram lavados cinco vezes com tampão de lavagem e com incubação de cinco minutos;
 9. Posteriormente, 100 μ L de solução tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados aos poços e a placa incubada por mais 15 minutos.
 10. 50 μ L de solução de interruptora foram adicionados e;
 11. Finalmente, a absorbância da placa foi lida a 450nm em Espectrofotômetro Perkin Elmer®.

Para o teste ELISA GM-CSF, a placa já veio pronta para o ensaio. Dessa forma, os passos para tornar a placa sensível foram desnecessários. Para realização do teste, as instruções fornecidas no manual do kit Thermofisher® foram seguidas.

5.3.4.9 Imunohistoquímica

A marcação por imunohistoquímica foi realizada em colaboração, uma vez que a técnica requer experiência e reagentes de alto custo para obtenção de resultados confiáveis.

5.3.4.10 Análises estatísticas

O *software* GraphPad Prism® 7.0a foi utilizado para realização dos testes estatísticos do presente trabalho, com confiança estatística de 95% ($p < 0.05$). As diferenças estatísticas foram feitas por meio do teste *one-way* ANOVA, com comparações múltiplas e específicas para grupos controle. O teste de regressão linear foi utilizado para avaliação do índice de confiança das curvas-padrão para os testes de ELISA.

5.3.4.11 Quantificações de áreas de colágeno marcadas com tricromo Masson e imunohistoquímica realizadas com software Image J®

1. Contraste das imagens foi aumentado em 3%, para facilitar a diferenciação das cores pelo software em todas as imagens;
2. O perfil de cores foi alterado para RGB Stack, permitindo a separação dos tons vermelhos, verdes e azuis;
3. Em ambas as marcações, uma imagem com clara diferenciação foi utilizada para definição dos limites mínimos e máximos de limite apresentados nas tabelas 4 e 5, respectivamente, que foram posteriormente utilizados para mensuração das áreas nas imagens:

Tabela 4 - Limites mínimos e máximos para área vermelha nas marcações de tricromo Masson e imunohistoquímica para colágeno.

Marcação Vermelho	Limite Mínimo	Limite Máximo
Tricromo Masson	0	64
Imunohistoquímica	0	48

Tabela 5 - Limites mínimos e máximos para área azul nas marcações de tricromo Masson e imunohistoquímica para colágeno.

Marcação Azul	Limite Mínimo	Limite Máximo
Tricromo Masson	110	160
Imunohistoquímica	135	180

4. Cinco cortes de cada lâmina de um animal foram mensuradas, com os valores mencionados, para obtenção das áreas de colágeno no tecido pulmonar;
5. Os valores foram exportados para o Excel, onde foi calculada a razão de área de colágeno pela área saudável;
6. Os resultados foram exportados para o software GraphPad Prism®, onde os gráficos foram construídos e a análise estatística de diferença significativa por one-way ANOVA foi realizada.

6. RESULTADOS

6.1 Variação do peso dos camundongos

A variação da média do peso dos camundongos em cada grupo de tratamento está exposta na figura 3. Os dados encontram-se expressos em média dos grupos, com barras representando erro padrão. Após teste estatístico one-way ANOVA, observou-se que não houve variação significativa no peso dos camundongos nos diferentes grupos ao longo do período de tratamento e avaliação até o dia da eutanásia.

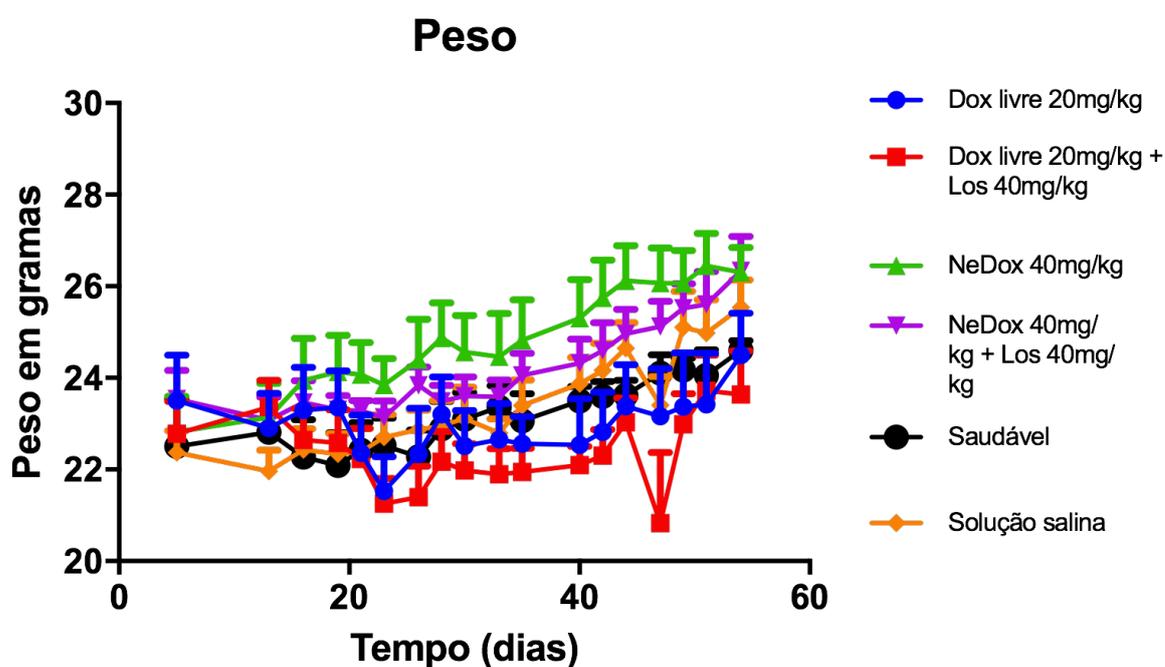


Figura 3 - Variação da média dos pesos dos camundongos ao longo de 5 semanas

No intuito de observar a perda de peso dos camundongos e sua relação com o peso dos tumores primários, os camundongos foram pesados no dia da eutanásia e tiveram o valor do peso dos tumores primários, excisados e pesados após a eutanásia, decrescidos. O resultado, expresso em média, com barras representando erro padrão, encontra-se na figura 4. Segundo teste estatístico one-way ANOVA, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas.

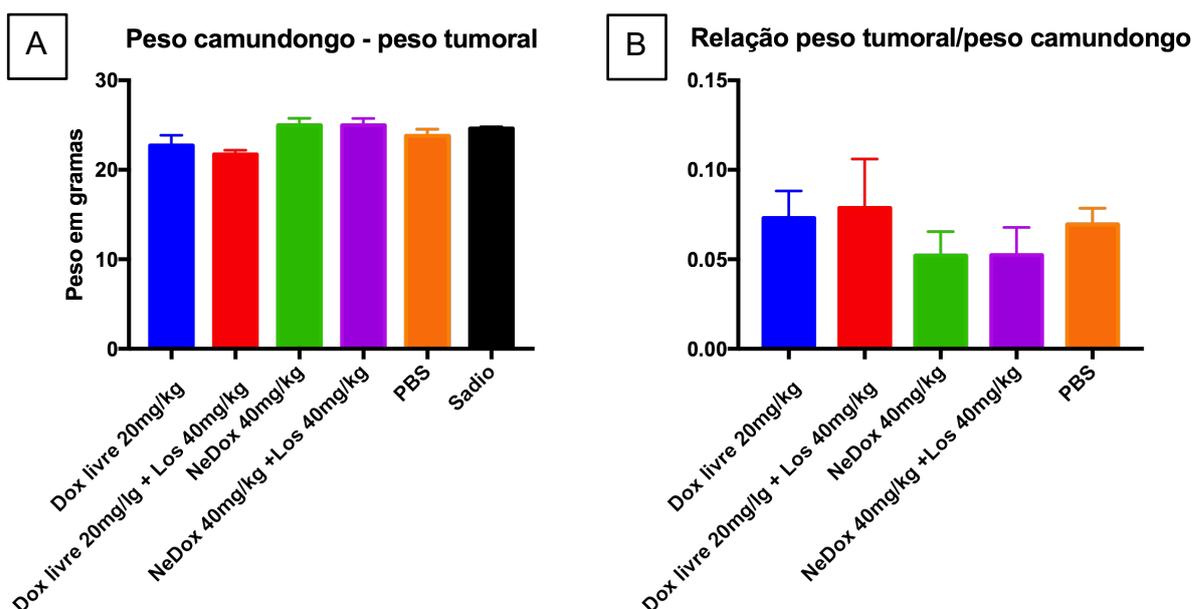


Figura 4 – A) Peso corpóreo dos camundongos no dia da eutanásia decrescido do peso do tumor, obtido após excisão pós-eutanásia e B) relação do peso tumoral com o peso do camundongo

6.2 Variação volume tumoral

O volume tumoral foi acompanhado por mensuração com paquímetro em dias alternados a partir da quarta semana após o enxerto. O resultado encontra-se exposto na figura 5, com valores de média dos grupos de tratamento e barras representando erro padrão. Os maiores volumes tumorais observados, assim como a maior progressão, são do grupo tratado com a solução salina tampão (PBS), seguido pelo grupo tratado com Doxorrubicina Livre + Losartana. O grupo com menor volume tumoral até o dia da eutanásia foi o tratado com Doxorrubicina livre, resultado esperado e já observado em estudos prévios do grupo (CÂMARA, NAGEL, *et al.*,

2017). No entanto, segundo teste estatístico one-way ANOVA, não houve diferença estatística significativa nos resultados obtidos.

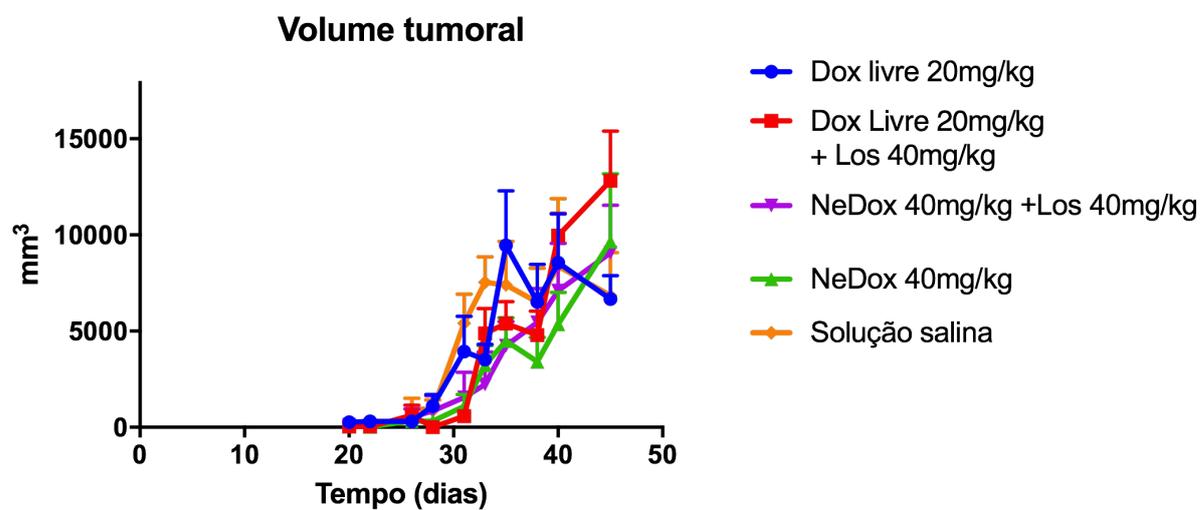


Figura 5 - Variação do volume tumoral em camundongos tratados com Dox livre, Dox livre + Los, NeDox, Nedox + Los e Solução salina

6.3 Registro fotográfico durante tratamento

O aspecto físico dos camundongos após a primeira semana de administração intraperitoneal dos tratamentos e losartana encontra-se representada na figura 6. Camundongos apresentam pelugem normal, sem piloereção e se movimentavam como habitualmente. Nota-se pequena protuberância no flanco traseiro esquerdo em todos os animais.

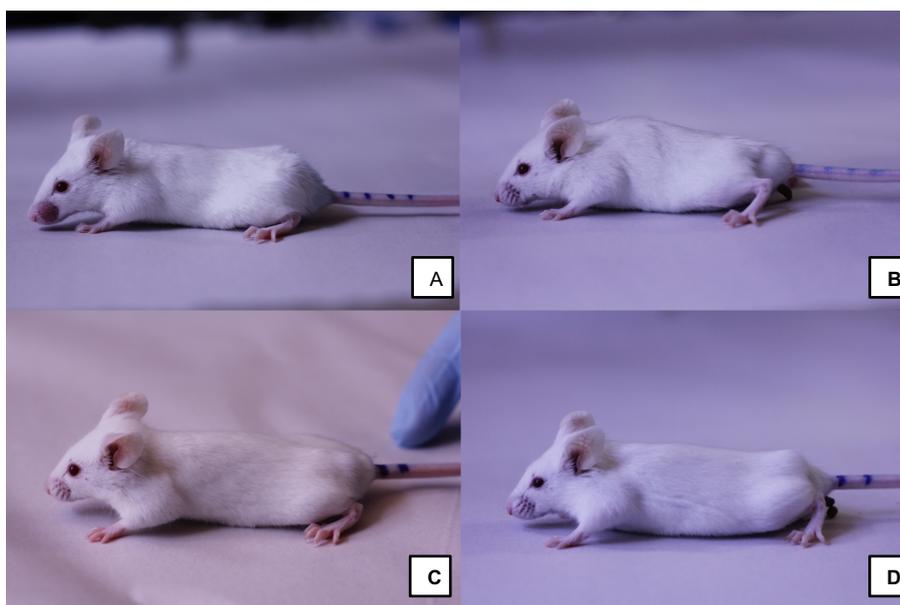


Figura 6 - Fotos da semana 1 após a administração intraperitoneal dos grupos de tratamento. (A) Doxorubicina livre, (B) Doxorubicina livre + Los, (C) NeDox e (D) NeDox + Los.

O aspecto físico dos camundongos na segunda semana após a administração intraperitoneal dos grupos de tratamento e losartana pode ser observado na figura 7. Apesar de em nível muito pequeno, nota-se piloereção na pelugem, bem como

posição corporal mais encolhida, indicando estresse. Observar crescimento do tumor primário macroscópica no flanco traseiro esquerdo.

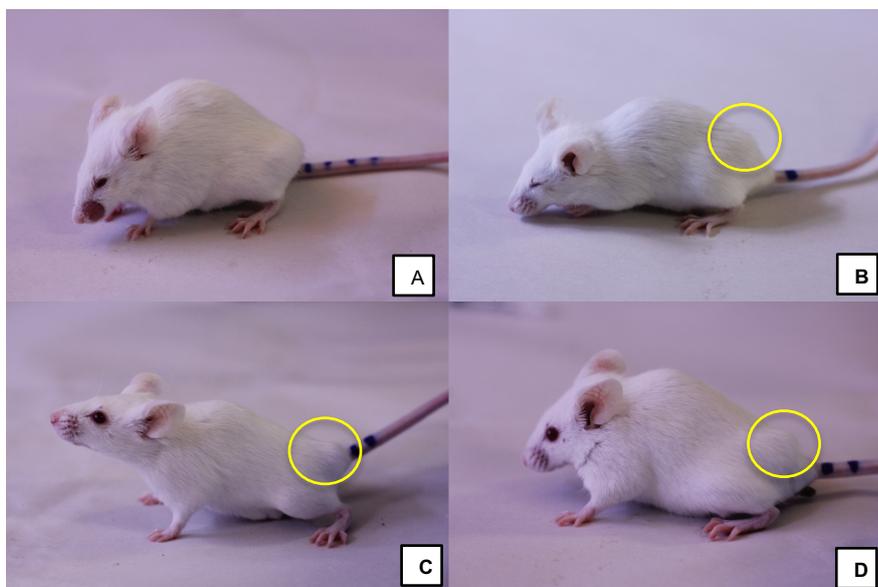


Figura 7- Fotos da semana 2 após a administração intraperitoneal dos grupos de tratamento. (A) Doxorubicina livre, (B) Doxorubicina livre + Los, (C) NeDox e (D) NeDox + Los.

Fotos da terceira semana após o tratamento e administração de losartana podem ser observadas na figura 8. Pelos arrepiados na região de crescimento tumoral, assim como tumor primário bem estabelecido e visível, em todos os grupos.

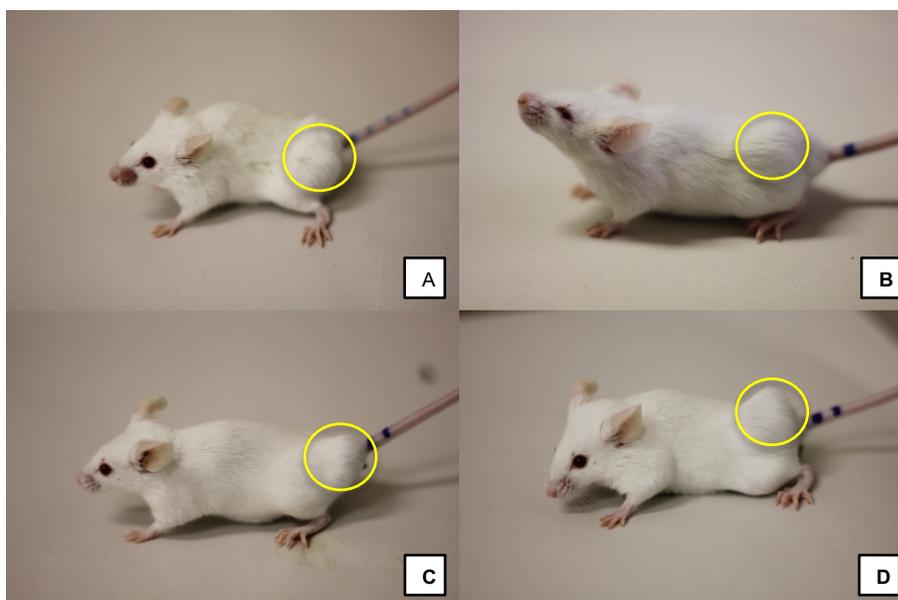


Figura 8 - Fotos da semana 3 após a administração dos grupos de tratamento. (A) Doxorubicina livre, (B) Doxorubicina livre + Los, (C) NeDox e (D) NeDox + Los.

Na figura 9 estão os registros de um animal de cada grupo de tratamento após quatro semanas. Se observa com clareza o arrepio dos pelos, bem como o tumor primário em todos os grupos de tratamento. Camundongos letárgicos e com perda de pelo na região do nariz, ambos indicativos de estresse.

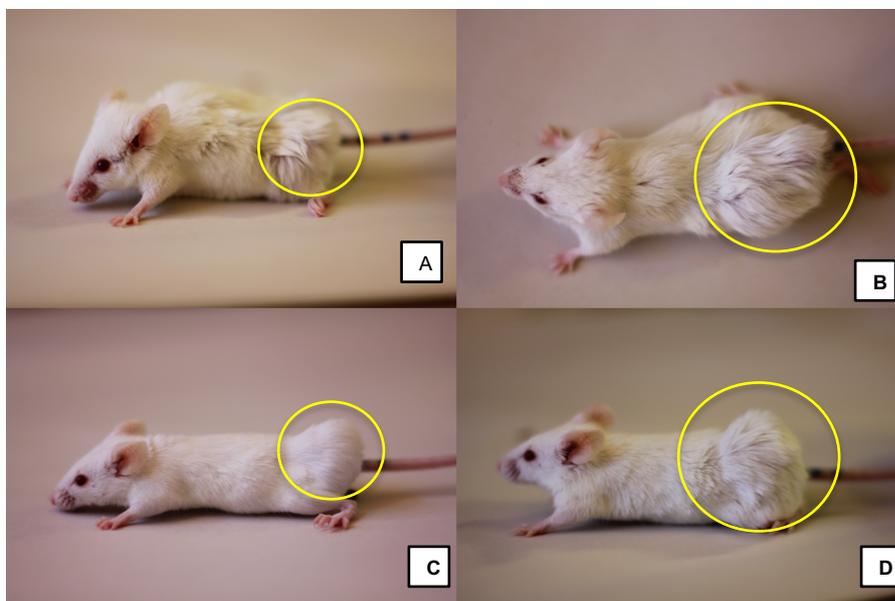


Figura 9 - Fotos da semana 4 após a administração dos grupos de tratamento. (A) Doxorrubicina livre, (B) Doxorrubicina livre + Los, (C) NeDox e (D) NeDox + Los

6.4 Sobrevivência

O grupo com maior mortalidade é o representado pelo tratamento com doxorubicina livre, onde dois camundongos morreram ao longo do tratamento, mesmo com uma dose de 20mg/kg, fazendo com que apenas 60% dos animais chegassem até a quinta e última semana de avaliação. Os outros grupos tiveram um óbito por grupo, mesmo tendo o dobro de dosagem, chegando à quinta semana de acompanhamento com 80% do grupo vivo. Os dados encontram-se representados na figura 10, em gráfico de sobrevivência representado em percentual.

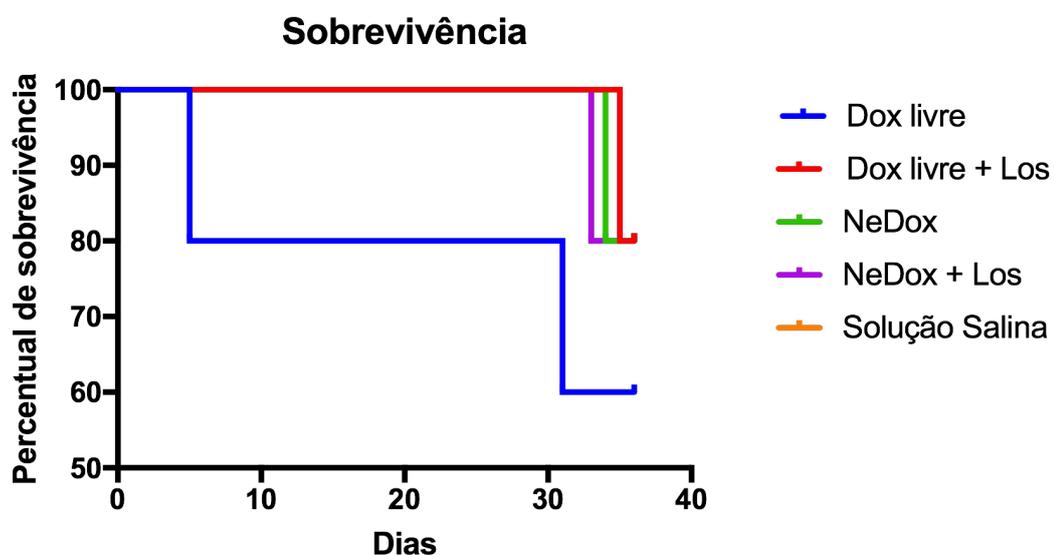


Figura 10 – Gráfico de sobrevivência dos grupos com Dox livre, Dox livre + Los, NeDox, NeDox + Los e Solução Salina.

6.6 Peso Pulmonar

Após a eutanásia os pulmões foram excisados e pesados, e a média da relação do peso pulmonar com o peso do camundongo de cada grupo está representado na figura 11, sendo as barras representativas de erro padrão. O * denota diferença estatística com $P \leq 0.05$ e ** $P < 0.001$ em teste one-way ANOVA para os grupos de Dox livre e Solução Salina, respectivamente, em comparação ao peso pulmonar do grupo sadio. Os pulmões com maior média de peso são representados pelo grupo tratado com a solução salina tampão (PBS), seguidos pelo grupo tratado com Dox livre. Os grupos tratados com NeDox, NeDox + Los e Dox livre + Los não apresentaram significância estatística do grupo sadio.

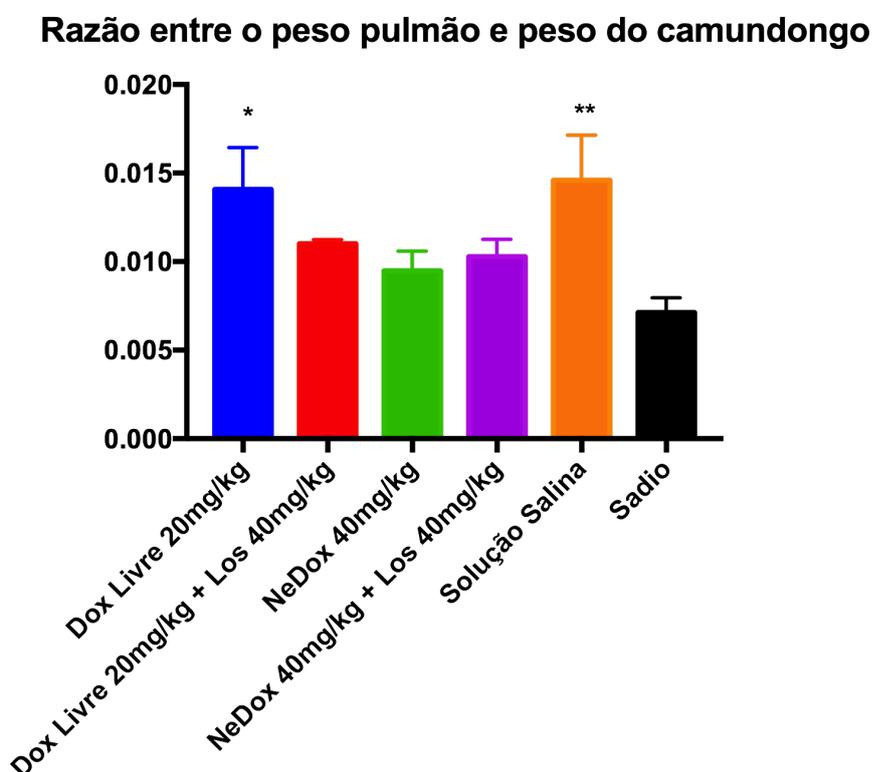


Figura 11 - Representação da relação do peso pulmonar e o peso do camundongo expresso em média do grupo

6.7 Número de nódulos pulmonares macroscópicos

A média de nódulos macroscópicos em cada grupo, contados por meio visual, encontra-se representada no gráfico acima, representados em média dos valores obtidos em cada grupo experimental, sendo as barras representativas do erro padrão da média. Observa-se que os grupos de tratamento com Doxorrubicina livre e solução salina tampão (PBS) apresentam o mesmo nível, sendo assim considerados os grupos com maior presença de nódulos macroscópicos. O grupo com menor nível de nódulos macroscópicos encontra-se representado pelo grupo de tratamento com NeDox+Los, seguidos sem diferença significativa pelo grupo de tratamento com NeDox.

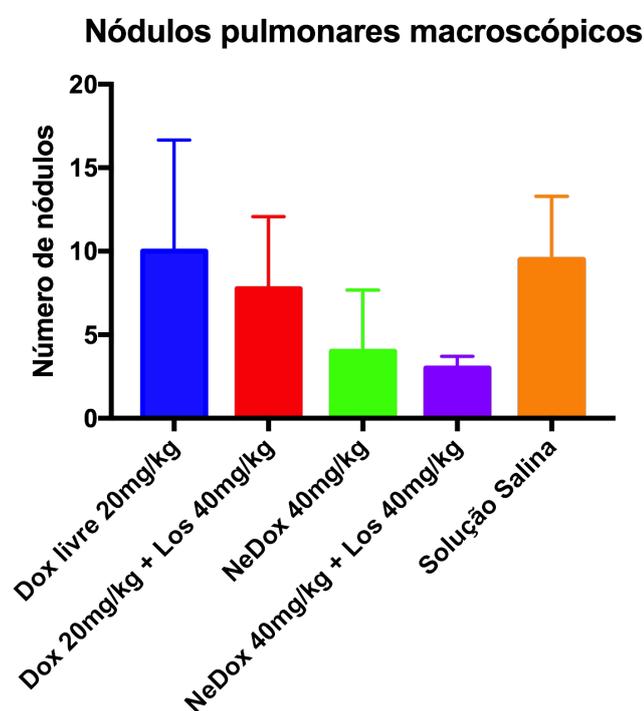


Figura 12 - Média do número de nódulos em cada grupo. Barras representam erro padrão.

6.8 Peso do coração

Os pesos dos corações encontram-se representados em média dos valores obtidos em cada grupo experimental, expostos na figura 13, sendo as barras representativas do erro padrão da média. Após teste one-way ANOVA, nenhuma diferença estatística foi observada.

Razão entre o peso do coração e o peso do camundongo

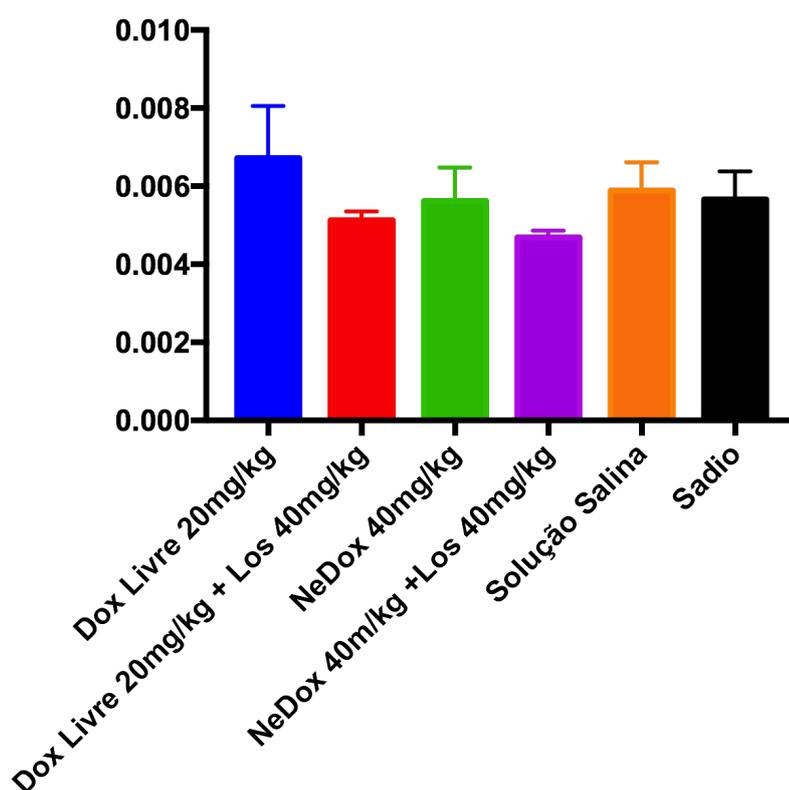


Figura 13 – Média do peso dos corações em cada grupo experimental

6.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay – ELISA

Para calibração do experimento e garantia de resultados reais e padronizados em forma de concentração, o *kit* do ensaio imunológico de ELISA vem com material para formação de curva-padrão após leitura em espectrofotômetro, que corresponde à relação gráfica entre os valores de absorvância e os de concentração, permitindo calcular um fator de conversão de valores de absorvância em concentração da molécula de interesse. A equação da curva obtida foi $Y=0.00199*X+340.4$, com $R^2=0.87$. O resultado encontra-se expresso na figura 14, com valores representando a média de cada grupo de tratamento e barras representando erro padrão. Segundo teste estatístico one-way ANOVA, não houve diferença significativa entre os níveis de TGF- β dos diferentes grupos de tratamento.

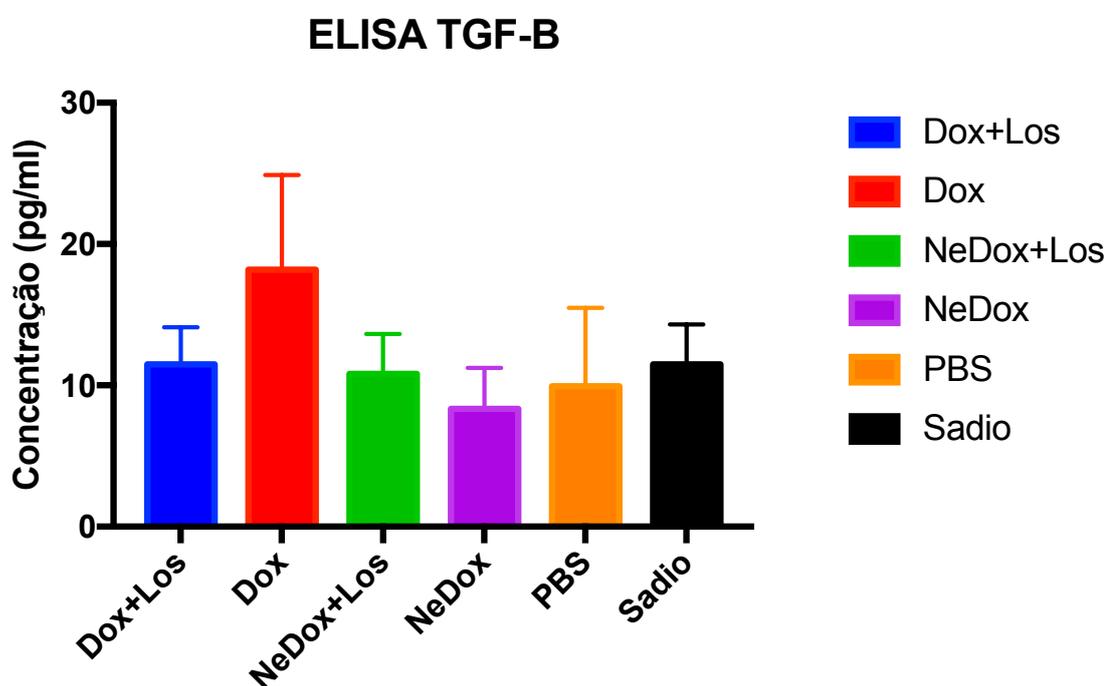


Figura 14 - Concentração de TGF-B expressa em média dos grupos, com barras representando erro padrão. Leitura de absorvância a 450nm.

O *kit* de ELISA para GM-CSF também veio com instruções para formação de uma curva-padrão para transformação de valores de absorbância em concentração da molécula de interesse. A equação obtida foi $Y=3.359e-006*X+0.009244$, com resultado, expresso em média dos valores obtidos nos grupos, encontra-se na figura 15.

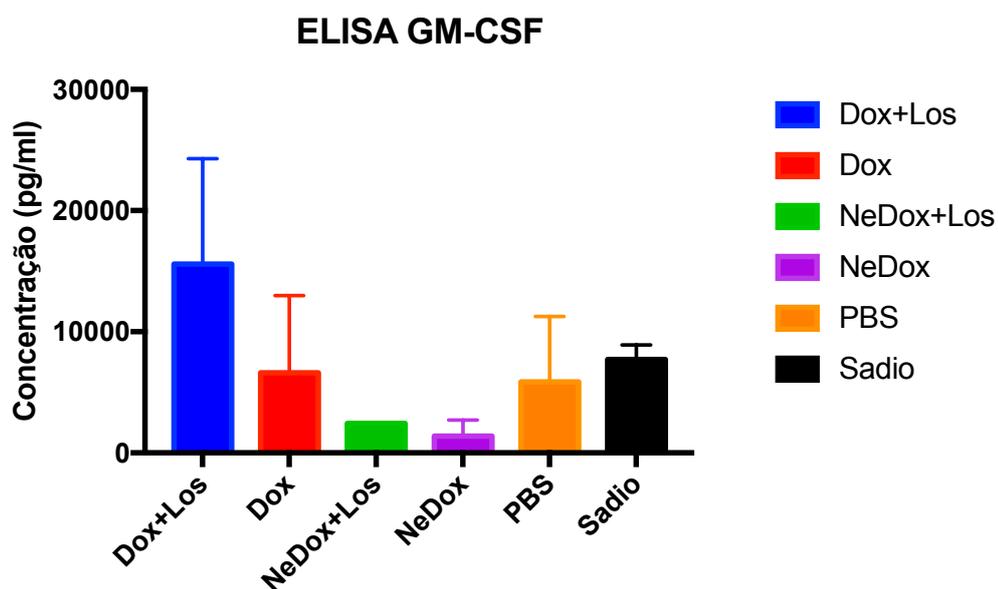


Figura 15 - Concentração de GM-CSF expressos em média de grupo, com barras representando erro padrão. Leitura de absorbância a 450nm.

O teste estatístico one-way ANOVA também foi realizado para o ensaio ELISA de GM-CSF, e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

6.10 Histologia do tecido pulmonar

6.10.1 Coloração por eosina e hematoxilina

Fotomicrografias para visualização do estado geral do tecido pulmonar de camundongo tratado com Dox Livre pode ser avaliada na figura 16. Observa-se alta densidade celular, bem como espessamento dos septos alveolares, indicador de edema e processo inflamatório. Ainda, no aumento de 60x (B), pode-se observar a presença de células estranhas ao tecido pulmonar, devido à morfologia polimórfica, bem como núcleo volumoso e presença de nucléolo evidente, indicando alta síntese proteica. Recorte em amarelo representa aproximação das células, tendo sido realizado para facilitar visualização.

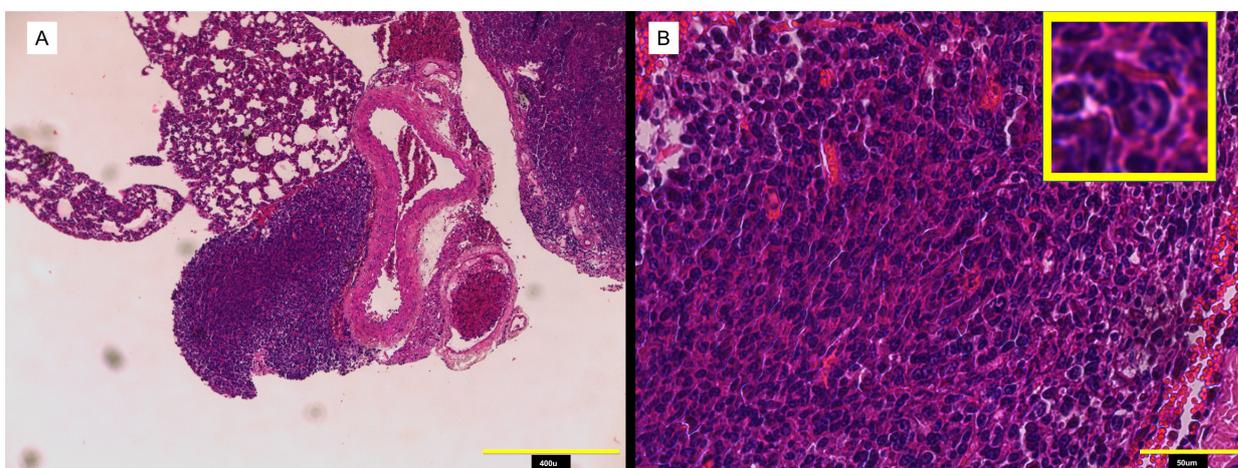


Figura 16 - Fotomicrografias de tecido pulmonar de camundongo tratado com Dox Livre. Aumentos de (A) 40x e B) 60x, com barras representando 400µm e 50µm, respectivamente.

Fotomicrografias para visualização do estado geral do tecido pulmonar de camundongo tratado com Dox Livre + Losartana encontram-se expostas na figura 17. Observa-se alta densidade celular, bem como espessamento dos septos alveolares, indicador de edema. Ainda, no aumento de 60x (D), pode-se observar a presença de células estranhas ao tecido pulmonar devido à morfologia polimórfica, bem como núcleo volumoso e presença de nucléolos evidentes, indicando alta síntese proteica. Recorte em amarelo representa aproximação das células, tendo sido realizado para facilitar visualização.

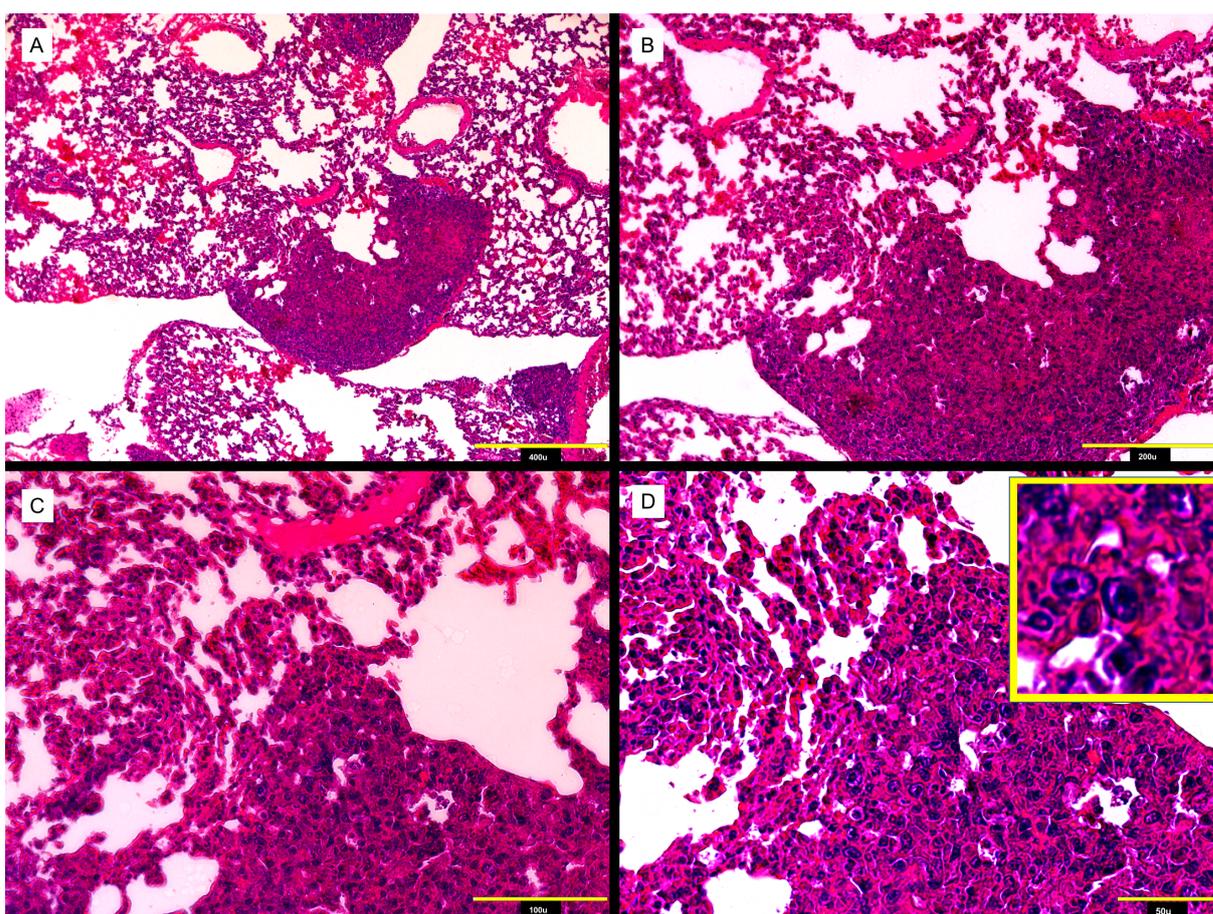


Figura 17 - Fotomicrografias de tecido pulmonar de camundongo tratado com Dox Livre + Losartana. Aumentos de (A) 10x, (B) 20x, (C) 40x e (D) 60x, com barras representando 400µm, 200µm, 100µm 50µm, respectivamente.

Na figura 18, representante do grupo de NeDox, há espessamento das paredes alveolares, como anteriormente observado, bem como massas células na periferia que possuem células que são, pelas características apresentadas, estranhas ao tecido pulmonar. Recorte em amarelo dá foco para o núcleo volumoso e presença de nucléolo.

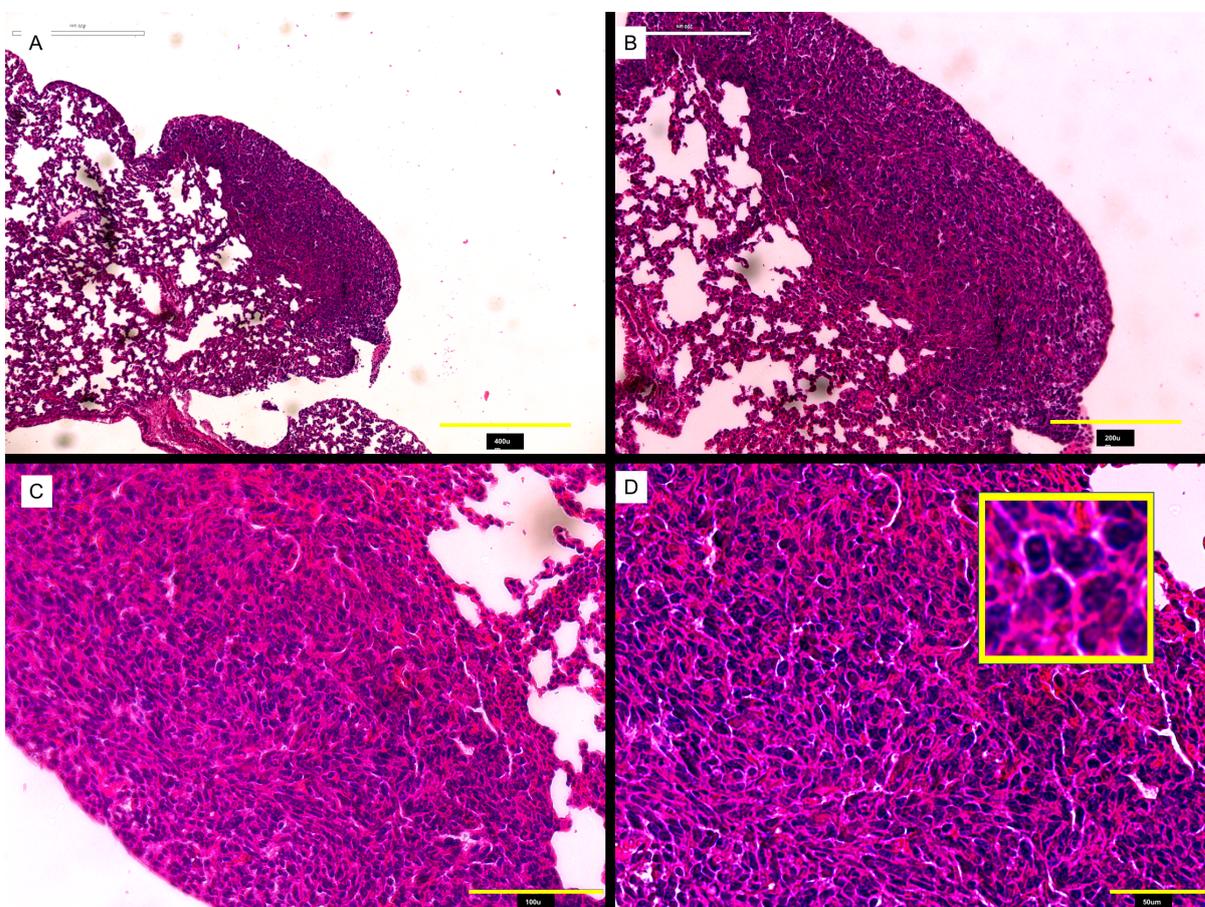


Figura 18 - Fotomicrografias de tecido pulmonar de camundongo tratados com NeDox. Aumentos de (A) 10x, (B) 20x, (C) 40x e (D) 60x, com barras representando 400 µm, 200 µm, 100 µm e 50 µm, respectivamente.

Observa-se menor grau de espessamento nas paredes alveolares, mesmo que haja alta densidade celular na região alveolar, na figura 19, representativa do grupo NeDox+Los. Na região periférica encontra-se aglomerado de células, que apresentam características de células geralmente não encontradas em tecido pulmonar, apresentando forma polimórfica, núcleo volumoso e presença de nucléolo evidente, sinalizando alta atividade proteica.

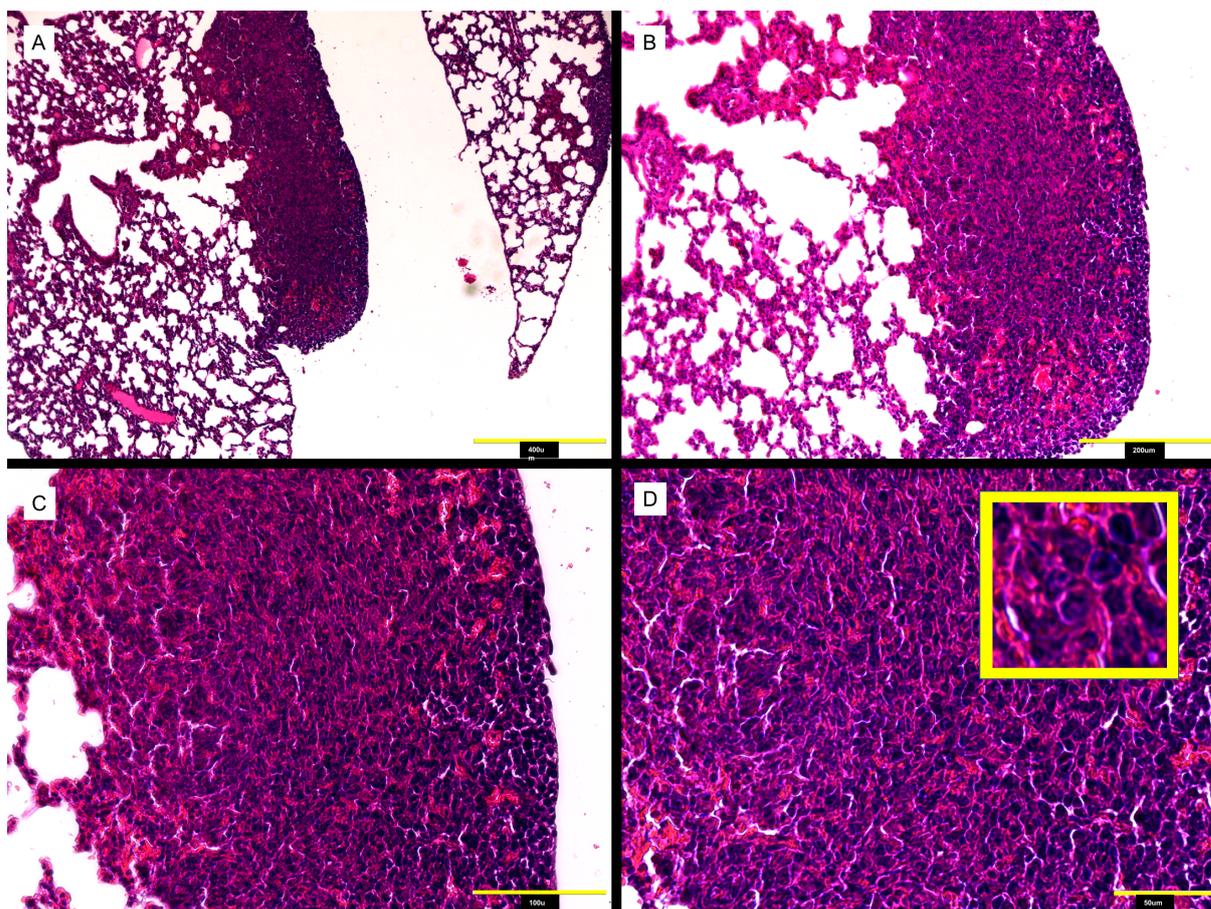


Figura 19 - Fotomicrografias de tecido pulmonar de camundongo tratado com NeDox + Los. Aumentos de (A) 10x, (B) 20x, (C) 40x e (D) 60x, com barras representando 400µm, 200µm, 100µm 50µm, respectivamente.

A figura 20 expões o grupo tratado com solução salina, onde assim como em todos os outros apresenta características de processo inflamatório caracterizado pelo espessamento da parede alveolar, bem como massas celulares na periferia com células estranhas ao tecido, polimórficas e com núcleo volumoso

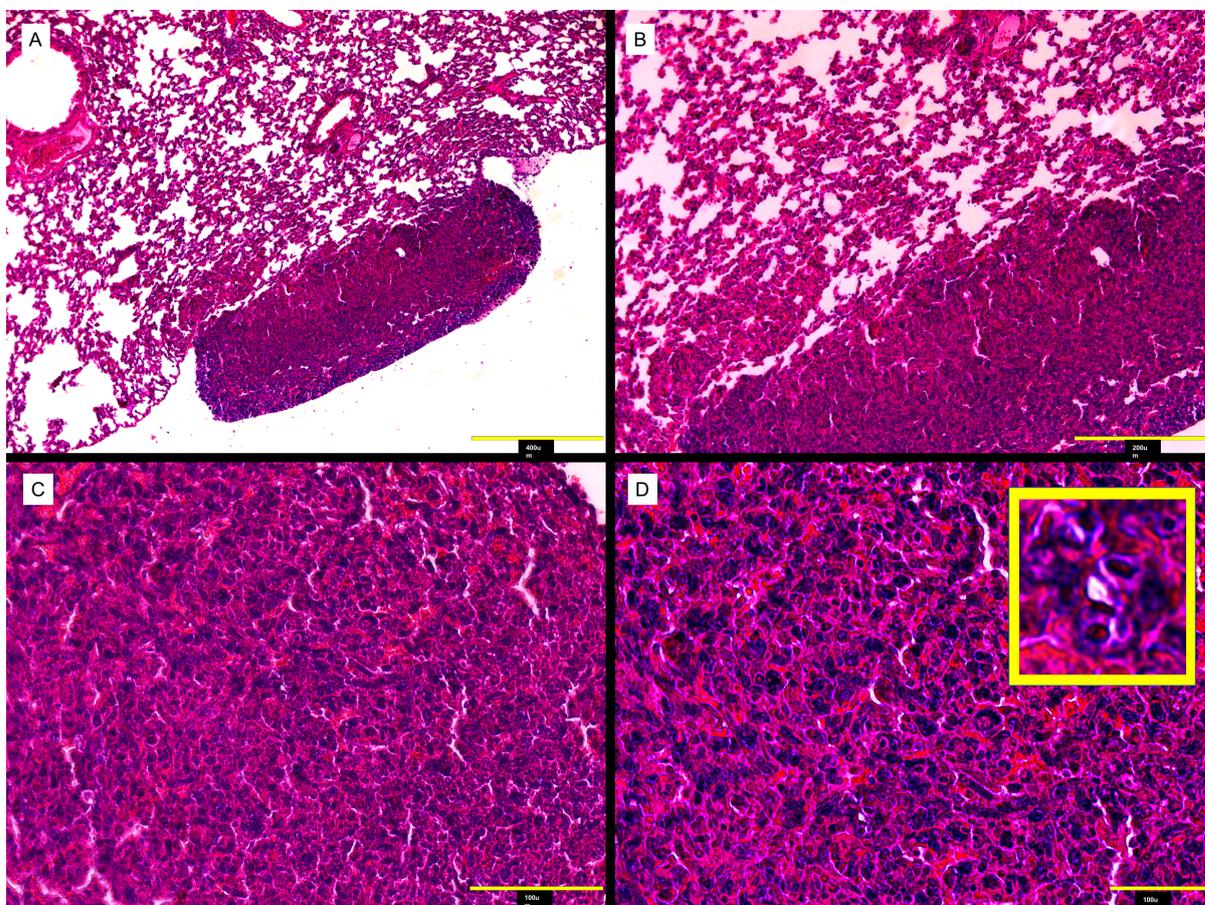


Figura 20 - Fotomicrografias de tecido pulmonar de camundongo tratado com solução salina. Aumentos de (A) 10x, (B) 20x, (C) 40x e (D) 60x, com barras representando 400µm, 200µm, 100µm 50µm, respectivamente. Recorte com bordas amarelas representa zoom da região com células possivelmente cancerosa.

6.10.2 Coloração por tricromo Masson

Para definição dos limites máximos e mínimos na marcação de colágeno por tricromo Masson, uma região com a coloração bem delimitada foi escolhida. A Fotomicrografia na figura 21 representa a marcação controle de colágeno com tricromo Masson no tecido pulmonar de camundongo.

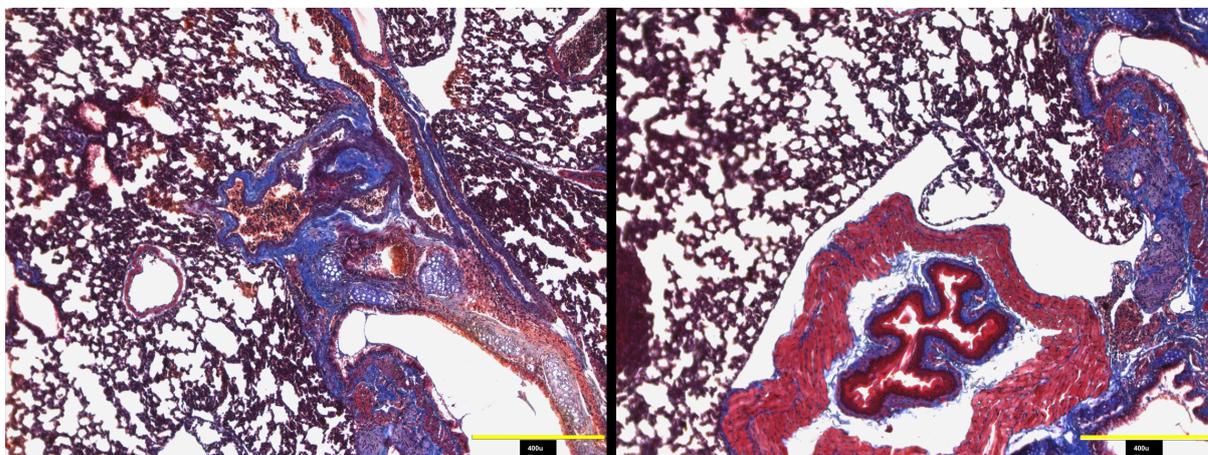


Figura 21 - Fotomicrografias para efeitos de controle de colágeno, marcado em azul com tricromo Masson. Aumento de 10x, barras representam 400 μ m.

Fotomicrografias de lâminas histológicas de tecido pulmonar coradas com tricromo de Masson para possível visualização do colágeno podem ser observadas na figura 22, onde estão representados todos os grupos, com colágeno marcado azul. A separação de cores para mensuração da área de colágeno foi realizada no software ImageJ®, como descrito em métodos, e a quantificação de área dos tecidos apresentada em forma de gráfico.

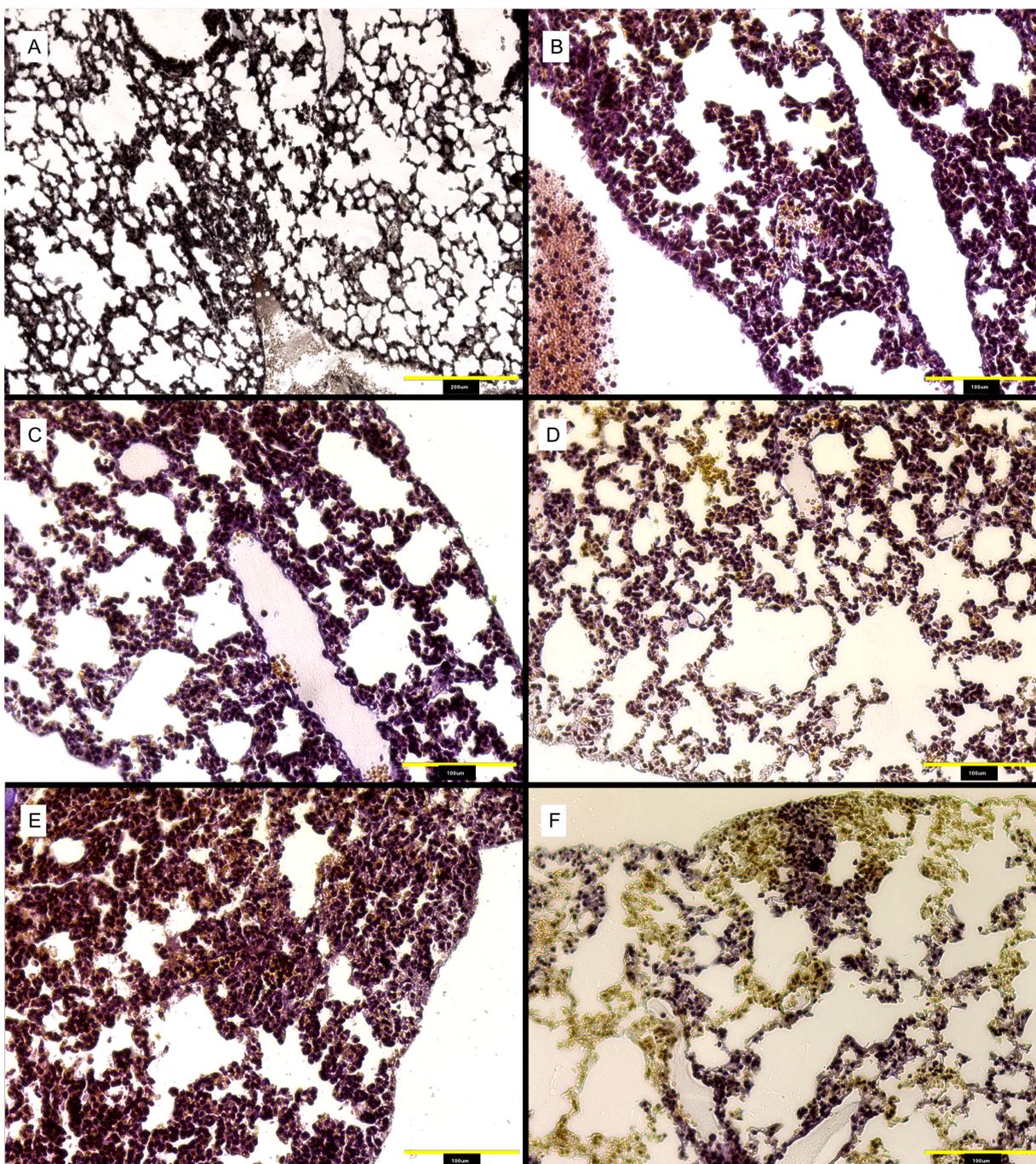


Figura 22 - Fotomicrografia de marcação para colágeno realizada com tricromo Masson. Aumento de 40x, barras representam 100µm. A) Dox Livre + Los, B) Dox Livre, C) NeDox + Los, D) NeDox, E) Solução Salina e F) Sadio.

A quantificação total da área de colágeno por coloração em tricromo masson realizada com o software ImageJ® para cada grupo está apresentada na figura 23. Segundo teste estatístico one-way ANOVA, realizado com o software GraphPad Prism, há diferença significativa entre os grupos levando em consideração intervalo

de confiança de $P < 0.05$, com $P = 0.0012$. Na avaliação estatística de cada grupo em comparação ao grupo Sadio, observa-se que os grupos Dox Livre + Los, NeDox, Nedox + Los, após o teste one-way ANOVA, não apresentam diferença significativa de marcação para colágeno, enquanto os grupos Dox Livre ($P = 0.0174$) e Solução salina ($P = 0.002$), sim.

Quantificação de área de colágeno por coloração em tricromo Masson

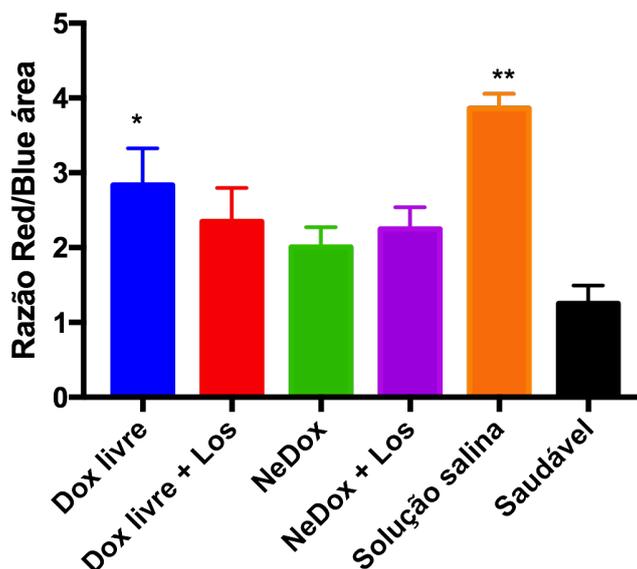


Figura 23 - Área de colágeno por em lâminas histológicas de tecido pulmonar coradas com tricromo Masson. Valores expressos em média por grupo, barras representando erro padrão.

6.10.3 Imunohistoquímica para colágeno

De maneira a corroborar os resultados obtidos pela coloração de tricromo Masson, a imunohistoquímica do tecido pulmonar para colágeno também foi realizada em todos os grupos de tratamento, e o resultado pode ser observado nas figura 24, onde a marcação em marrom é representativa do colágeno.

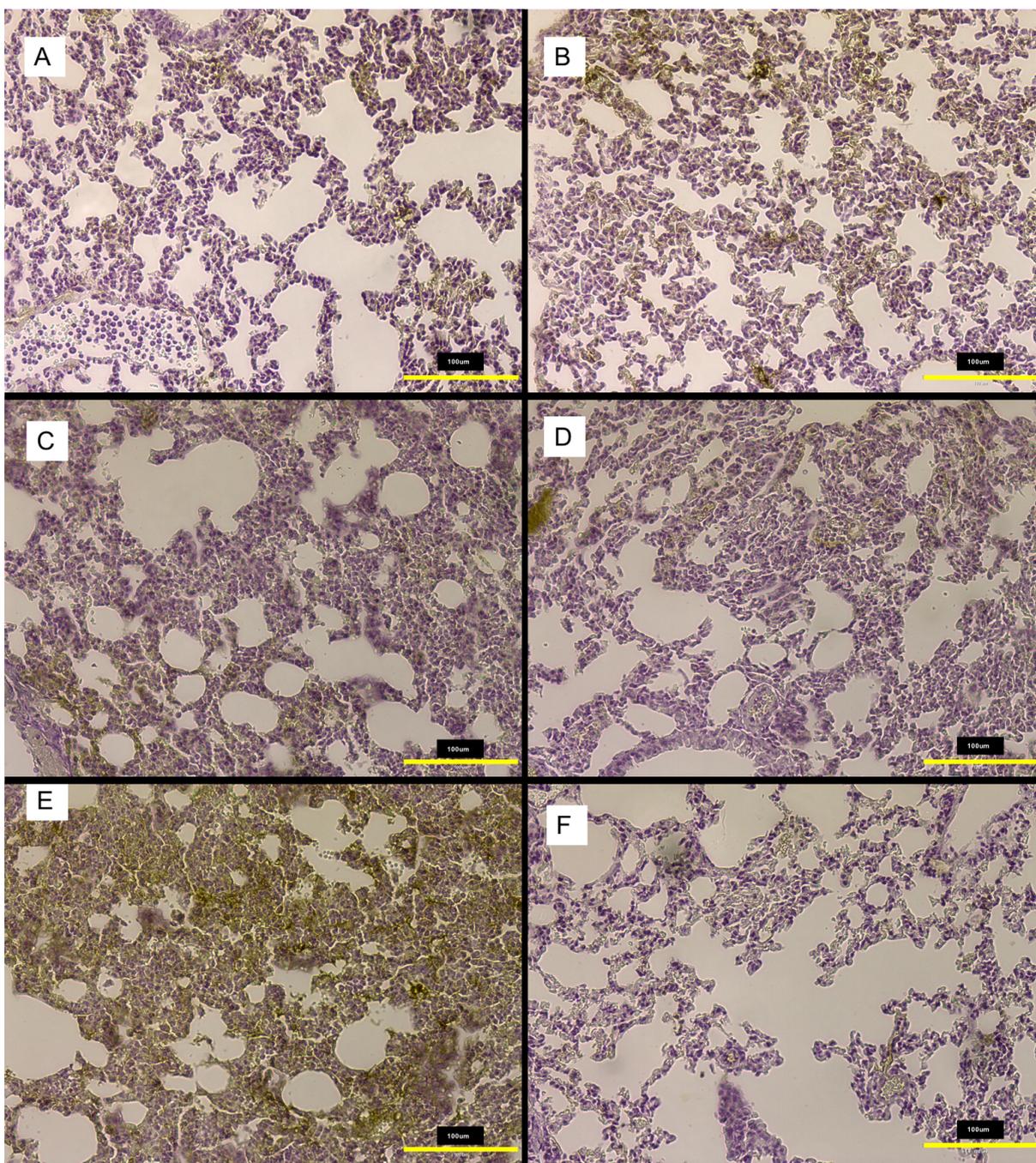


Figura 24 - Fotomicrografia de marcação para colágeno realizada por imunohistoquímica. Áreas marrons são positivas para colágeno, enquanto áreas roxas são negativas. Aumento de 40x, barras representam 100µm. A) Dox Livre + Los, B) Dox Livre, C) NeDox+Los, D) NeDox e F) Sadio.

A quantificação da área de colágeno por marcação para colágeno feita por imunohistoquímica realizada com o software ImageJ® expressa em valores de média dos grupos encontra-se na figura 25. Segundo teste estatístico one-way ANOVA, realizado com o software GraphPad Prism, há diferença significativa entre os grupos levando em consideração intervalo de segurança $P < 0.05$, com $P < 0.0001$ de resultado

após análise. Em teste estatístico one-way ANOVA realizada para comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle sadio, os resultados obtidos foram: grupo Dox livre e NeDox+Los não apresentaram diferença estatística significativa, enquanto os grupos Dox Livre + Los ($P=0.0051$), NeDox ($P=0.001$) e solução salina ($P=0.001$), sim.

Área de colágeno por marcação imunohistoquímica

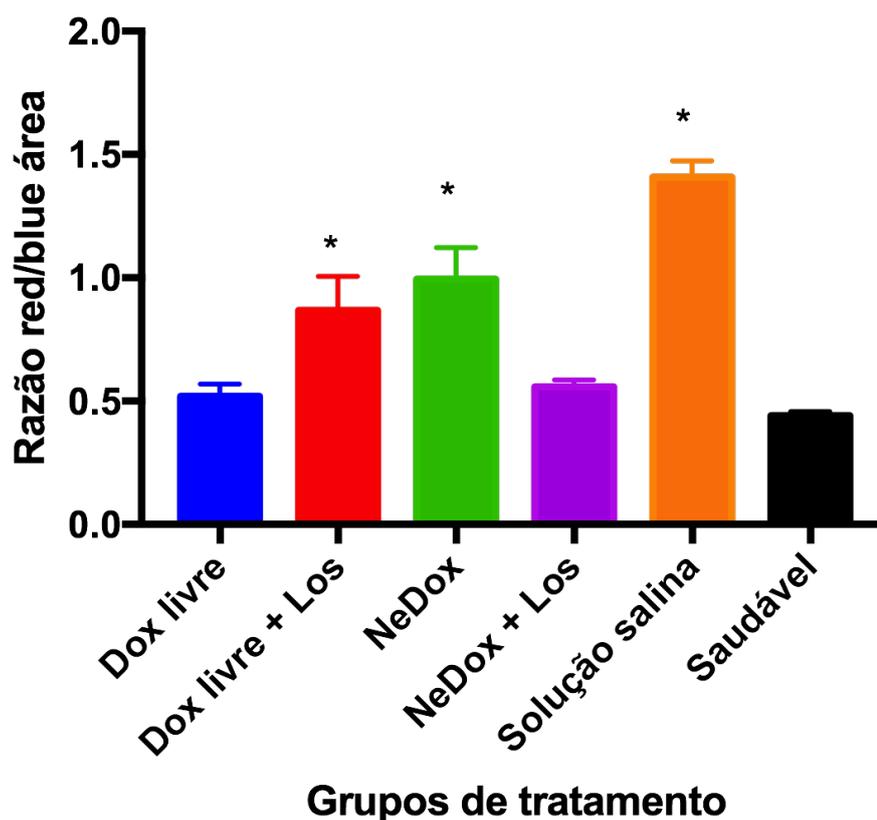


Figura 25 – Área de colágeno por marcação com imunohistoquímica em tecido pulmonar. Valores expressos em média por grupo, barras representando erro padrão.

7. DISCUSSÃO

Estudos demonstram o efeito positivo da doxorrubicina em inibir o crescimento tumoral (TACAR, SRIAMORNSAK e DASS, 2012), mas não em prevenir a disseminação de células cancerosas a sítios secundários. Apesar de ser um fármaco utilizado como quimioterápico em clínica há anos, a doxorrubicina apresenta diversos efeitos adversos para o paciente, sendo a cardiotoxicidade o mais proeminente e preocupante (KRISCHKE *et al.*, 2016). Com o intuito de potencializar os efeitos da doxorrubicina para o tratamento de neoplasias, diversas abordagens de tratamentos conjuntos são realizadas (BASELGA *et al.*, 1993; SCHIFFELERSA *et al.*, 2003), bem como a associação de tecnologias que facilitem o carreamento, aumentem o tempo de circulação e/ou protejam os tecidos saudáveis da ação citotóxica da doxorrubicina (GABIZON, SHMEEDA e BARENHOLZ, 2003; SHARMA, JAIN e SAREEN, 2013; TIANA *et al.*, 2014), como é o caso do Doxil®. Os custos desses tratamentos são, como previamente mencionado, caros e comumente indisponíveis em centros de tratamento brasileiros. Uma possível abordagem para o uso da droga é o emprego da nanotecnologia em seu carreamento e direcionamento, uma vez que nanopartículas podem ser funcionalizadas para apresentarem características desejáveis ao processo de entrega de fármacos (DELLIAN *et al.*, 2000). A abordagem sugerida neste trabalho é o emprego de nanoemulsões para melhorar a eficiência do fármaco em eliminar as células cancerosas ao chegar de forma mais eficiente em locais de difícil acesso, como tecidos pobres em oxigenação, pressão positiva e vasos fenestrados, característicos do microambiente tumoral por meio do efeito EPR (LONGO, MUEHLMANN, *et al.*, 2015). Ainda, esperava-se que as nanoemulsões contendo doxorrubicina fossem mais eficientes no tratamento de metástases, como anteriormente observado por outros grupos (GABIZON, SHMEEDA e BARENHOLZ, 2003).

Nos estudos mencionados (DIOP-FRIMPONG *et al.*, 2011; GAOA *et al.*, 2011), a losartana foi capaz de diminuir o grau metastático do modelo 4T1 em pulmões. Apesar dos dados com diferenças estatísticas significantes apresentados no peso pulmonar, Figura 11, não houve diferença estatística significativa na presença de nódulos pulmonares contados em lupa, Figura 12, o que contradiz resultados apresentados em literatura (DIOP-FRIMPONG *et al.*, 2011; GAOA *et al.*, 2011). As

diferenças observadas podem ser devido a inúmeros fatores, como a diferença do modelo tumoral utilizado neste estudo, à frequência de aplicação e duração do período de tratamento. A dose de 40mg/kg escolhida dentre as três diferentes apresentadas, que variavam de 20mg/kg a 60mg/kg (DIOP-FRIMPONG *et al.*, 2011; LI ZHANG e HE, 2016), pensando nos efeitos adversos associados ao uso de losartana relativos a pressão corpórea dos camundongos e excesso de excreção urinária, podendo ter sido insuficiente para obtenção de resultados semelhantes devido ao período de tratamento dos animais.

Tratando-se do tumor primário, a literatura apresenta a losartana como um descompressor de vasos que facilitaria o acesso de drogas e auxiliaria no processo de chegada do fármaco a área de interesse, no entanto observou-se que não houve diferença significativa entre o volume tumoral dos grupos tratados com administração simultânea de losartana aos que não receberam o fármaco. Dessa forma, resultados obtidos não se assemelham aqueles obtidos anteriormente pelo nosso grupo, no qual a diferença dos volumes tumorais de camundongos tratados com doxorubicina associada à sistemas nanotecnológicos foi significativamente menor do que os tratados com doxorubicina livre (GANASSIN *et al.*, 2018; CÂMARA *et al.*, 2017). O protocolo de tratamento foi semelhante nos diferentes trabalhos, tendo duração total de cinco dias consecutivos e acompanhamento posterior, bem como concentrações administradas semelhantes. Os resultados podem diferir por diferentes razões: primeiro, uma baixa concentração do fármaco que realmente chega ao tecido alvo. Apesar de existir um processo de angiogênese associado ao crescimento de tumores primários (CARMELIET e JAIN, 2000; ZHAO e ADJEI, 2015), os vasos são fenestrados e ineficazes para que o fármaco consiga chegar ao tecido (LONGO *et al.*, 2015), diminuindo sua eficácia. Segundo, a pressão positiva tumoral gerada pela alta densidade de matriz extracelular no ambiente (DIOP-FRIMPONG *et al.*, 2011) pode ter dificultado ainda mais a trajetória do fármaco, impedindo que ele se difundisse de forma eficiente pelo microambiente tumoral. Terceiro, parte do volume tumoral se deve, na realidade, a algum processo inflamatório que promova edema, além do recrutamento de células imunológicas, fazendo com que o volume apresentado não corresponda totalmente à alta densidade de células cancerosas (COUSSENS e WERB, 2002). Quarto, o desenvolvimento de resistência ao quimioterápico pelas células cancerosas enxertadas nos camundongos, que representam um tumor em

estágio avançado e altamente metastático (PULASKI, 2018), anteriormente observadas em humanos (AAS, BØRRESEN, *et al.*, 1996). Esperava-se que os grupos de tratamento associados a nanoemulsão fossem capazes de sobrepor as dificuldades do fármaco chegar no microambiente tumoral e se difundir de forma eficiente por ele, diminuindo o volume tumoral primário. No entanto, os resultados não apresentaram diferença significativa. Por último, se deve levar em consideração as dificuldades e erros inerentes ao modelo de medição do tumor primário, realizado com paquímetro. Apesar de possuir acurácia limitada, a mensuração do volume tumoral por paquímetro é uma técnica bem estabelecida e utilizada em literatura para acompanhamento da eficácia de tratamentos experimentais (GANASSIN, HORST, *et al.*, 2018). No entanto, possui muitas limitações e erros inerentes à técnica, como dificuldade em mensurar o crescimento inicial dos tumores primários e o próprio manuseio do camundongo durante o tratamento, já que eles não podem ser anestesiados para mensuração em dias alternados, uma vez que tal técnica geraria interferência nos resultados obtidos porque o uso de anestésicos pode estar associado à baixa imunológica e letargia (KUROSAWA e KATO, 2008). Dessa forma, uma maior margem de erro padrão pode ser observada nos resultados de mensuração do volume tumoral realizados com o paquímetro. Mesmo quando observado os erros inerentes da técnica, nota-se um menor controle proliferativo que leva ao crescimento do tumor primário nos grupos tratados com doxorrubicina livre. Com respeito aos resultados associados à administração de doxorrubicina associada à nanoemulsões, em resultados do grupo não publicados, a mensuração do volume tumoral pelo aparelho IVIS Lumina® (que mede a bioluminescência das células cancerosas) apontou que houve, sim, redução significativa do grupo tratado com a doxorrubicina associada a nanoemulsões, corroborando com a hipótese de que o processo inflamatório da região contribui para o aumento do volume medido pelo paquímetro.

Com o intuito de avaliar o efeito do tratamento sobre o estado clínico, o peso dos camundongos começou a ser coletado um dia antes do enxerto de células tumorais 4T1 e passou a ser acompanhado com intervalo de um dia entre as coletas de peso. O acompanhamento da variação do peso corporal é importante por ser um indicador da condição clínica do animal já que em casos de tratamentos tóxicos, habitualmente observa-se uma perda de peso que pode relacionar-se com fatores como a perda de apetite e a possível sensação de dor e náusea, efeitos adversos

comumente observados em pacientes que se submetem a tratamentos quimioterápicos. Ao final do tratamento observa-se que não há uma diferença significativa entre os grupos de tratamento, e nem entre o peso inicial e o final obtido. Torna-se importante ressaltar, novamente, que o ganho de peso e manutenção do mesmo foi mais proeminente nos camundongos que pertenciam aos grupos de tratamento com a doxorubicina associada à nanoemulsão. Ainda, os grupos tratados com a doxorubicina livre estavam ligeiramente abaixo da linha dos camundongos saudáveis sem tumor. Com a intenção de corroborar os dados clínicos que indicavam a o estado dos camundongos, registros fotográficos foram realizados de maneira que o aspecto estético do animal também pudesse ser avaliado. No caso dos camundongos tratados apenas com doxorubicina, foi possível observar a piloereção, característico em animais estressados, bem como a perda da pelugem na região do focinho. Por meio das fotografias também pode-se ter uma noção do tamanho e evolução dos tumores primários, bastante proeminente nos grupos de doxorubicina livre. Nesse aspecto, os resultados da presente avaliação corroboram com resultados já obtidos presentes em literatura e em nosso grupo de pesquisa: a associação da nanotecnologia não aumenta os efeitos tóxicos ou prejudica o ganho e manutenção do peso dos camundongos (CÂMARA *et al.*, 2017; GANASSIN *et al.*, 2018).

Como mencionado, não houve variação significativa no peso dos camundongos nos diferentes grupos ao longo do período de tratamento e avaliação até o dia da eutanásia. Nota-se, no entanto, uma maior manutenção e ganho de peso nos camundongos tratados com o grupo NeDox, seguidos pelo grupo tratado com NeDox+Los. Neste caso, o maior peso observado não se deve à presença de massa tumoral primária, uma vez que na análise de peso corpóreo sem o peso do tumor primário e da relação do peso tumoral com o peso corpóreo, os resultados observados reiteram a melhor manutenção do peso, apesar de não serem estatisticamente significativos.

A doxorubicina é especialmente tóxica para o coração porque aumenta a ativação de receptores do tipo Toll, proteínas do sistema imunológico que são responsáveis pela ativação de vias morte celular, levando a processos inflamatórios e necróticos em as células cardíacas, o que gera a cardiopatia, que pode ser aguda ou crônica (TACARA, SRIAMORNSAKB e DASSA, 2012). A doxorubicina é, também, responsável pelas alterações estruturais dos cardiomiócitos, fazendo com que eles

enlargueçam e assim aumentem o tamanho do coração. Para verificar a toxicidade associada, os corações dos camundongos foram pesados após excisão e não apresentaram diferença estatística significativa no peso e tampouco na relação com o peso corporal. Os grupos tratados com nanoemulsão, no entanto, apresentaram valores de média menores do que aqueles tratados com a doxorrubicina livre, não apresentando indícios de cardiotoxicidade.

Um dos motivos pelos quais a losartana foi escolhida como droga adjuvante no processo de tratamento deve-se ao receptor de angiotensina II também afetar vias de sinalização de TGF- β , que estão diretamente envolvidas na produção de colágeno por CAFs (AKHURST, 2002). Neste caso, a Losartana poderia ter sido utilizada como meio de promover a regulação negativa ou inibição dessa via de ativação de TGF- β , uma vez que este está relacionado ao *crosstalk* de vias que ativam a produção e deposição de colágeno na matriz extracelular. Dessa forma, esperava-se que os níveis de TGF- β encontrados no soro sanguíneo dos camundongos tratados com losartana fosse inferior aqueles encontrados nos níveis dos outros grupos de tratamento. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de tratamento que receberam administração de losartana, que já havia sido observada em outros estudos (ZHANG *et al.*, 2016), principalmente quando comparado ao grupo Sadio. Posteriormente verificou-se em literatura que são somente os níveis de TGF- β ativados que diminuem (ZHANG *et al.*, 2016), o que não poderia ter sido observado no ensaio de ELISA para a molécula, sendo esta uma possível justificativa para a pouca diferença observada.

O GM-CSF é um dos três tipos de fatores estimuladores de colônia, que são essenciais para proliferação, diferenciação, maturação e ativação funcional de células hematopoiéticas. O GM-CSF, especificamente, é um fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (FRANCISCO-CRUZ, AGUILAR-SANTELISES, *et al.*, 2013), produzido pelas células mesenquimais em resposta a processos inflamatórios de células hematopoiéticas e locais periféricos, recrutando neutrófilos, monócitos e outras células de defesa para região, visando aumentar a resposta do hospedeiro (SHI, LIU, *et al.*, 2006). Quando disfuncional, pode estar relacionado a mecanismos autócrinos e parácrinos envolvidos na proliferação de células tumorais (FRANCISCO-CRUZ, AGUILAR-SANTELISES, *et al.*, 2013). Nos resultados apresentados neste trabalho, o espectrofotômetro foi incapaz de encontrar e ler valores de absorbância

em pelo menos uma das amostras de todos os grupos de tratamento. Pode-se observar que os grupos que apresentam maior nível de GM-CSF são os tratados com a doxorrubicina livre, seguidos pelos grupos com administração intraperitoneal simultânea de losartana. Apesar de não apresentarem diferença estatística significativa, o menor nível de presença de GM-CSF pode indicar menores níveis de processos inflamatórios acontecendo na amostra. Os dados de GM-CSF se corroboram na histologia do tecido pulmonar, onde o grupo tratado com doxorrubicina em sua forma livre é o que apresenta maior número de evidências que apontam para um processo inflamatório, como o espessamento das paredes alveolares, indicadores de edema (também encontrado em outras amostras histológicas, mas em menores graus).

Apesar dos resultados de ELISA para TGF- β não terem apresentado diferença estatística significativa, as marcações de colágeno no tecido pulmonar apresentaram dados que corroboram com as diferenças observadas entre os grupos. Nos estudos mencionados nesta discussão (DIOP-FRIMPON *et al.*, 2011; GAOA *et al.*, 2011), a losartana foi capaz de diminuir o grau metastático do modelo 4T1 em pulmões, resultado corroborado pela menor presença de colágeno encontrado nas marcações com tricromo Masson e imunohistoquímica. Apesar dos dados com diferenças estatísticas significantes apresentados no peso pulmonar, não houve diferença estatística significativa na presença de nódulos pulmonares contados em lupa, o que pode ser explicado pelo método de quantificação dos nódulos, pouco acurado tratando-se de nódulos pouco visíveis. As diferenças observadas neste trabalho podem se dever a inúmeros fatores, como a diferença do modelo tumoral utilizado neste estudo, à frequência de aplicação e duração do período de tratamento

Em trabalhos anteriores do grupo apresentados em congresso (Cardador *et al.*, 2017), os níveis de colágeno encontrados nos tecidos pulmonares apresentaram diferença estatística significativa. Como pode ser observado pela coloração de tricromo Masson, os grupos não tratados com losartana apresentam uma maior marcação de colágeno, dados corroborados pela imunohistoquímica, onde o grupo de solução salina apresentou a maior marcação positiva para colágeno em todos os grupos. Esses resultados corroboram a hipótese de que o colágeno possui maior deposição em tecidos tumorais, bem como se encontram presentes nos tecidos de colonização secundária em níveis anormais. Dessa forma, apesar da análise

histológica não evidenciar diferença visual no tecido pulmonar dos diferentes grupos de tratamento, as marcações evidenciaram a diferença no tecido pulmonar para presença de colágeno, mostrando que a losartana foi eficiente em diminuir a deposição do mesmo nos tecidos secundários, principalmente quando administrada simultaneamente à nanoemulsão com doxorubicina. Em estudos futuros diferentes abordagens podem ser utilizadas para potencializar o efeito da losartana, como o aumento de sua dose – evitando os efeitos adversos associados, prolongamento do tempo de uso ou administração anterior e durante o período de tratamento.

As lâminas histológicas de tecido pulmonar foram avaliadas em comparação ao tecido pulmonar Sadio, sem espessamento da parede alveolar indicadora de processo inflamatório. Por meio da histologia observou-se que nenhum dos tratamentos foi capaz de prevenir a colonização de tecidos secundários por células tumorais, como pode ser verificado principalmente grupo tratado com Dox livre + Los, onde uma grande densidade de células polimórficas, com núcleo volumoso e nucléolo evidente pode ser observada na periferia do tecido pulmonar. Devido ao processo de obtenção das lâminas histológicas, algumas amostras ficaram pouco nítidas, o que dificultou o processo de avaliação das mesmas.

Por fim, ainda se tratando da avaliação de presença de metástases pulmonares nos camundongos, em resultados não publicados do acervo do grupo, a leitura de bioluminescência das células *in vivo* foi realizada pelo aparelho IVIS Lumina®, onde foi observado menor nível bioluminescente na região torácica dos camundongos tratados com a doxorubicina associada à nanoemulsões e administração simultânea de losartana. Esse resultado corrobora a hipótese de que maiores níveis de colágeno estão associados a maiores níveis de metástases e que a losartana possui efeito positivo no tratamento das mesmas, diminuindo sua presença nos tecidos pulmonares.

8. CONCLUSÃO

A atividade da doxorubicina associada à nanoemulsões (NeDox e NeDox + Los) não apresentou diferença estatística significativa daquela observada no tratamento com Dox livre no controle do volume tumoral primário, assim como também não foi eficiente em prevenir a disseminação das células tumorais para o tecido pulmonar. Ainda, notou-se que o sistema de nanoemulsão e doxorubicina não apresentou toxicidade significativa, uma vez que o peso dos camundongos e de seus corações não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas aos animais saudáveis. Por fim, a associação de losartana diminuiu significativamente o nível de colágeno nos tecidos pulmonares nos grupos tratados com losartana, mas não influenciou decisivamente os níveis de TGF- β e GM-CSF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAS, T. et al. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nature Medicine*, 811-814, Julho 1996.
- AKHURST, R. J. TGF- β antagonists: Why suppress a tumor suppressor? *The Journal of Clinical Investigation*, 109, 1533–1536, Junho 2002.
- ANOTHASINTAWEE, T. et al. Risk Factors of Breast Cancer A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asia-Pacific Journal of Public Health*, Maio 2014.
- BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28, 3587–3593, 2007.
- BARENHOLZ, . Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, 160, 117–134, Março 2012.
- BARKAN, D.; GREEN, J.; CHAMBERS, A. Extracellular matrix: A gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *European Journal of Cancer*, 46, 1181-1188, Fevereiro 2010.
- BASELGA, J. et al. Antitumor Effects of Doxorubicin in Combination With Anti-epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Agosto 1993.
- BHUSHAN, B. (Ed.). *Springer Handbook of Nanotechnology*. 4ª Edição. ed. Berlin: Bhushan, Bharat,; v. 1, 2017. p. 1-1698, ISBN 978-3-662-54355-9.
- CÂMARA, A. L. D. S. et al. Acid-sensitive lipidated doxorubicin prodrug entrapped in nanoemulsion impairs lung tumor metastasis in a breast cancer model. *Nanomedicine*, Julho 2017.
- CARDADOR, C. M. et al. **Evaluation of collagen levels in lung metastasis derived from a murine mammary adenocarcinoma model after treatment with nanoemulsions loaded with doxorubicin.** 1st Joint EACR-MRS Conference Seed and Soil In Vivo Models of Metastasis. Berlim: [s.n.]. Novembro 2017. p. 73.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 249-257, Setembro 2000.
- CHAUHAN, P. et al. Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nature Communications*, 1-11, Outubro 2013.
- CHEN, et al. Losartan increases bone mass and accelerates chondrocyte hypertrophy in developing skeleton. *Molecular Genetics and Metabolism*, 115, 53-60, Fevereiro 2015.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 860-867, Dezembro 2002.
- COX, R. et al. LOX-Mediated Collagen Crosslinking Is Responsible for Fibrosis-Enhanced Metastasis. *Microenvironment and Immunology*, 1721-1732, Janeiro 2015.
- DELLIAN, M. et al. Vascular permeability in a human tumour xenograft: molecular charge dependence. *British Journal of Cancer*, Dezembro 2000.
- DIOP-FRIMPONG, et al. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *PNAS*, 108, 2909–2914, Fevereiro 2011.
- EGEBLAD, M. et al. Visualizing stromal cell dynamics in different tumor microenvironments by spinning disk confocal microscopy. **Disease models & mechanisms**, 1, 155-167, Outubro 2008.

EGEBLAD, M.; NAKASONE, E.; WERB, Z. Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. *Developmental Cell*, 884-901, 2015 Junho 2010.

PULASKI, B. ATCC®, 2018. Disponível em: <<https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2539.aspx#history>>. Acesso em: 03 Julho 2018.

FANG, J. et al. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 136-151, Maio 2011.

FANG, M. et al. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumor Biology*, Abril 2014.

FRANCISCO-CRUZ, A. et al. Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. *Med Onc*, Novembro 2013.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 24, 4195–4200, Dezembro 2010.

FRATZL, P. *Collagen - Structure and Mechanics*. Potsdam: [s.n.], v. 1, 2008. p. 1-506, ISBN 978-0-387-73905-2.

GABIZON, ; SHMEEDA, ; BARENHOLZ,. Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin Review of Animal and Human Studies. *Clin Pharmacokinet*, 42, 419-436, 2003.

GANASSIN, R. et al. Selol nanocapsules with a poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) shell conjugated to doxorubicin for combinatorial chemotherapy against murine breast adenocarcinoma in vivo. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, Maio 2018.

GAOA, Z.-G. et al. Prevention of Metastasis in a 4T1 Murine Breast Cancer Model by Doxorubicin Carried by Folate Conjugated pH Sensitive Polymeric Micelles. *J Control Release*, Maio 2011.

GEHLER, S. et al. Filamin A β 1 integrin complex tunes epithelial cell response to matrix tension. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 3224-3238, Maio 2009.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55, 1531–1546, Agosto 2003.

GILKES, D. M.; SEMENZA, G. L.; WIRTZ, D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 1-10, Maio 2014.

GOA, L.; WAGSTAFF, J. Losartan Potassium Drugs - A Review of its Pharmacology, Clinical Efficacy and Tolerability in the Management of Hypertension. *Drug Evaluation*, 55, 820-845, Maio 1996.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell - Leading Edge Review*, 144, Março 2011.

HYNES, R. O. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science*, 27, 1219-1226, Novembro 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 18 Julho 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, EUA. NIH - National Cancer Institute, 24 Maio 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.gov>>. Acesso em: 18 Julho 2017.

JIANG, S.-P. et al. Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion formulations loaded with doxorubicin. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 3141–3150, Agosto 2013.

- KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews*, 6, 392-401, Março 2006.
- KHOSHNOODI, ; PEDCHENKO, ; HUDSON, B. G. Mammalian Collagen IV. *Microscopy Research and Technique*, 71, 24, 357-370, Janeiro 2008.
- KLEINMAN, H. K. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 526-532, 2003.
- KRISCHKE, M. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of doxorubicin in children with cancer: results of a "European Pediatric Oncology Off-patents Medicines Consortium" trial. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, Outubro 2016.
- KUROSAWA, S.; KATO, M. Anesthetics, immune cells, and immune responses. *Journal of Anesthesia*, Agosto 2008.
- KUZET, S.-E.; GAGGIOLI, C. Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil. *Cell Tissue Res*, Abril 2016.
- LI ZHANG, Y. W. T. X. Q. Y. Q. Z. Y. Y. X. C. L. L. H. G. Z. Z.; HE, Q. Suppression for lung metastasis by depletion of collagen I and lysyl oxidase via losartan assisted with paclitaxel-loaded pH-sensitive liposomes in breast cancer. *Drug Delivery*, Janeiro 2016.
- LIU, et al. TGF- β blockade improves the distribution and efficacy of therapeutics in breast carcinoma by normalizing the tumor stroma. *PNAS*, 109, 9, 16618-16623. Outubro 2012.
- LONGO, J. P. F. et al. Preventing Metastasis by Targeting Lymphatic Vessels with Photodynamic Therapy Based on Nanostructured Photosensitizers. *Nanomedicine & Nanotechnology*, 2015.
- LOPEZ, J. I.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. Biomechanical regulation of cell orientation and fate. *Oncogene*, 24, 6981-6993, Novembro 2008.
- LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology*, 395-406, Fevereiro 2012.
- MAEDA, H. et al., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of controlled release*, 65, 271-284, Setembro 2001.
- MASON, T. G. et al. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18, R635-R666, 2006.
- MILLER, K. D. et al. Cancer Treatment and Survivorship Statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 271-289, Agosto 2016.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. WHO - Cancer - World Health Organization. **World Health Organization**, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 18 Julho 2017.
- PORTELLA, P. P. et al. **Avaliação dos mecanismos de resistência celular a quimioterápicos usando nanoemulsões contendo doxorubicina**. 23º Congresso de Iniciação Científica da UnB e 14º do DF. Brasília: [s.n.]. 2017.
- PROVENZANO, P. et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Medicine*, 4, 1-16, Dezembro 2006.
- SANDOO, A.; KITAS, G. D.; CARMICHAEL, A. R. Breast cancer therapy and cardiovascular risk: focus on trastuzumab. *Vascular Health and Risk Management*, Abril 2015.
- SCHIFFELERSA, R. M. et al. Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, Agosto 2003.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1, n. 1, 24-32, Janeiro 2010.

SHARMA, A.; JAIN, N.; SAREEN, R. Nanocarriers for Diagnosis and Targeting of Breast Cancer. *BioMed Research International*, Abril 2013.

SHI, Y. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Research*, Fevereiro 2006.

SICA, D. A.; GEHR, W. B.; GHOSH,. Clinical Pharmacokinetics of Losartan. *Clin Pharmacokinet*, 44, 797-814, 2005.

SUVIK, A.; EFFENDY, A. W. M. The use of modified masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. *Malaysian Journal of Veterinary research*, 39-47, Janeiro 2012.

TACAR, ; SRIAMORNSAK, ; DASS, R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy And Pharmacology* , 65, 17, 157–170, Junho 2012.

TACARA, O.; SRIAMORNSAKB, P.; DASSA, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy And Pharmacology*, Junho 2012. 157-170.

TIANA, Y. et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*, Fevereiro 2014.

Torchilin, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 131-135, Março 2010.

ZHANG, L. et al. Suppression for lung metastasis by depletion of collagen I and lysyl oxidase via losartan assisted with paclitaxel-loaded pH-sensitive liposomes in breast cancer. *Drug Delivery*, Janeiro 2016.

ZHAO, Y.; ADJEI, A. A. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor , Maio 2015. 1-14.

ANEXO

Declaração do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA)


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 8 de maio de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR NO DESENVOLVIMENTO DE METASTASES PULMONARES EM MODELOS DE TUMOR DE MAMA APÓS O TRATAMENTO COM DOXORRUBICINA ASSOCIADA A NANOEMULSÕES E A ADMINISTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE LOSARTANA.**”, Protocolo n.º 24/2018, sob responsabilidade do Professor João Paulo Figueiró Longo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: Mus musculus (25 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 20/05/2018 a 20/12/2018.




Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.